

**Friedrich-Schiller-Universität Jena**

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät  
Institut für Ernährungswissenschaften  
Lehrstuhl Lebensmittelchemie



# **Analytik und Vorkommen lebensmittelrechtlich relevanter mariner Biotoxine unter besonderer Berücksichtigung von Ciguatoxinen (CTXs) und Yessotoxinen (YTXs)**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
doctorum rerum naturalium  
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl. troph. Karin Röder  
geboren am 12. April 1983  
in Erfurt

1. Gutachter: Prof. Bernd Luckas (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Gutachter: Prof. Georg Pohnert (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
3. Gutachter: Prof. Dieter Schrenk (Technische Universität Kaiserslautern)

Tag der Disputation: 07. September 2010

Meinen Eltern und Großeltern  
mit Liebe und Dankbarkeit.

*„Am Ziele deiner Wünsche wirst du jedenfalls eines vermissen:  
dein Wandern zum Ziel.“*

Marie von Ebner-Eschenbach



1.3.4.1.2	Fluorimetrische Detektionsverfahren .....	22
1.3.4.1.1	UV/VIS Detektionsverfahren .....	23
1.3.4.2	Kapillarelektrophorese.....	23
1.4	Lebensmittelrechtliche Relevanz .....	24
1.4.1	Toxizität von CTXs und YTXs .....	24
1.4.2	Gesetzliche Regelungen .....	24
1.5	Fragestellungen/Zielsetzungen .....	26
2	Übersicht zu den Manuskripten .....	28
3	Manuskript I	
	Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of <i>Gambierdiscus</i> spp. ....	33
4	Manuskript II	
	Effects of salinity, temperature and nutrients on the yessotoxin production of <i>Protoceratium reticulatum</i> in connection with the cell cycle, cell size and chlorophyll <i>a</i> concentration .....	34
5	Manuskript III	
	Influence of phosphorus concentration on the yessotoxin formation of different strains of <i>Protoceratium reticulatum</i> .....	35
6	Manuskript IV	
	Complex yessotoxins profile in different strains of <i>Protoceratium reticulatum</i> .....	36
7	Manuskript V	
	Accumulation and metabolism of yessotoxin produced by <i>Protoceratium reticulatum</i> in Blue mussel ( <i>Mytilus edulis</i> ) and Pacific oyster ( <i>Crassostrea gigas</i> ) ....	37
8	Diskussion .....	38
9	Zusammenfassung.....	50
	Summary.....	54
10	Literaturverzeichnis .....	58
11	Erklärungen .....	71
12	Lebenslauf .....	72
	Danksagung .....	73

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
amu	Atomaric mass unit; Atomare Masseneinheit
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation; Chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck
API	Atmospheric Pressure Ionisation; Ionisierung unter Atmosphärendruck
APPI	Atmospheric Pressure Photoionisation.; Photoionisierung unter Atmosphärendruck
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning
ATX	Adriatoxin
AZA	Azapiracid; Azaspirosäure
AZAs	Azaspiracids; Azaspirosäuren
BTXs	Gruppe der Brevetoxinanaloge
bzgl.	Bezüglich
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCMP	Provasoli-Guillard National Center for culture of marine phytoplankton
CE	Collision Energy; Kollisionsenergie
CEP	Cell entrance potential; Spannung am Eingang der Kollisionszelle
C-CTX	Karibisches Ciguatoxin
CFP	Ciguatera Fish Poisoning
Chapt.	Chapter
CTX	Ciguatoxin
CTXs	Ciguatoxins; Ciguatoxine
COOH YTX	Carboxyyessotoxin
CXP	Cell exit potential; Spannung am Ausgang der Kollisionszelle
DA	Domoic Acid; Domoinsäure
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Direct current; Gleichspannung
di ds YTX	Bidesulfatiertes Yessotoxin
DMEQ-TAD	4-[2-(6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaliny)ethyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione)
DP	Declustering potential; Declustering-Spannung
DSP	Diarrhetic Shellfish Poisoning

---

DST	Diarrhetic Shellfish Toxin
ds-YTX	Desulfo-Yessotoxin
DTX	Dinophysistoxin
DTXs	Dinophysistoxins; Dinophysistoxine
EC	European comission
ECRA <sub>100</sub>	100 kDa großes E-Cadherin-Fragment
EFSA	European Food Safety Authority; Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay; auch Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA)
EP	Entrance Potential
ESI	Electro Spray Ionisation; Elektrospray-Ionisierung
EU	European Union; Europäische Union
evtl.	Eventuell
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations; Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
Fig.	Figure; Abbildung
FLD	Fluoreszenzdetektor
lt.	Laut
FP	Focussing Potential; Fokussierungs-Spannung
GA	Gambieric Acid; Gambiersäure
GIT	Gastrointestinaltrakt
GT	Gambiertoxin; Vorläufertoxin der Ciguatoxine
GTX	Gonyautoxin
HAB	Harmful algal bloom; schädliche Algenblüte
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; Hochleistungsflüssigchromatographie
homo YTX	Homoyessotoxin
I-CTX	Indisches Ciguatoxin
IFM-Peptid	Tripeptid welches die schnelle Inaktivierung des Na <sup>+</sup> -Kanals ermöglicht; besteht aus den Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM)
IOC	Intergovernmental Oceanographic Commision of UNESCO; zwischenstaatliche Kommission der UNESCO zur Ozeanografie
i.p.	Intraperitoneal
IS	Ionspray voltage; Ionisierungsspannung

---

K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
Kap.	Kapitel
KG	Körpergewicht
LC	Liquid Chromatography; Flüssigkeitschromatographie
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben
LOD	Limit of Detection; Nachweisgrenze
<i>m/z</i>	Verhältnis von Masse zu Ladung
MBA	Mausbioassay
MeOH	Methanol
MRM	Multi Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometer; Massenspektrometer
MS <sup>n</sup>	Produktionen-Analyse (PI) mit n-facher Wiederholung (z.B. mit dreifacher Wiederholung = MS <sup>3</sup> )
MS/MS	Triple Quadrupol; Tandemmassenspektrometer
MTX	Maitotoxin
MW	Molekulargewicht
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
Na <sub>v</sub>	Spannungsabhängiger Natrium-Kanal
NL	Neutral Loss; Neutralverlust
N-limitiert	Stickstofflimitiert, hier als Natriumnitrat (NaNO <sub>3</sub> ) im f/2 oder L1 Medium
NMR	Nuclear magnetic resonance; Kernspinresonanz
No.	Number; Nummer
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration; Wetter- und Ozeanografiebehörde der Vereinigten Staaten
Nr.	Nummer
NSP	Neurotoxic Shellfish Poisoning
OA	Okadaic Acid; Okadainsäure
OH COOH YTX	Hydroxycarboxyyessotoxin
OH YTX	Hydroxyessotoxin
P-CTX	Pazifisches Ciguatoxin
PbTx	Brevetoxin
PC	Precursor Ion; Vorläuferion
PDE	Phosphodiesterase-Aktivität
PI	Product-Ion; Produktion



---

P-limitiert	Phosphat limitiert, hier als Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) im f/2 oder L1 Medium
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
PTX	Pectenotoxin
PTXs	Pectenotoxine
Q1	Quadrupol 1 -> Massenspektrometer 1
q <sub>2</sub>	Quadrupol 2 -> Kollisionszelle
Q3	Quadrupol 3 -> Massenspektrometer 2
RF	Radio frequency; hochfrequente Wechselspannung
RIA	Radio Immuno Assay
RT	Retentionszeit
S.	Seite
S4	Segment 4; Spannungssensoren des Na <sub>v</sub> -Kanals
SIM	Single Ion Monitoring
STX	Saxitoxin
S/N	Signal to Noise; Verhältnis Signal zu Grundrauschen
sog.	Sogenannte
sp.	Spezies
spp.	Mehrere Spezies
Syn.	Synonym
Tab.	Table; Tabelle
TDI	Tolerable daily intake; duldbare tägliche Dosis
TEF	Toxicity equivalency factor; Toxizitätsäquivalenz-Faktor
TTX	Tetrodotoxin
u.a.	Unter anderem
vgl.	Vergleiche
WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation
YTX	Yessotoxin
YTXs	Yessotoxins; Yessotoxine
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Systematik der untersuchten Mikroalgen [10] .....	2
Abb. 2: Chemische Struktur der von <i>Gambierdiscus</i> spp. produzierten marinen Polyethertoxine .....	8
Abb. 3: Chemische Struktur der marinen Polyethertoxine P-CTX-1, C-CTX-1, PbTX-1, PbTX-2	9
Abb. 4: Modell der Sekundärstruktur des Na <sub>v</sub> -Komplexes, die Segmente S4 vermitteln als Spannungssensoren bei Depolarisation die Öffnung des Kanals, das IFM-Peptid blockiert nach Aktivierung die offene Pore und führt zur Schließung des aktivierten Kanals, nach NICHOLSON verändert (2006) [56, 89] .....	10
Abb. 5: Strukturen ausgewählter YTXs mit Modifikationen am C-9, C-32 und der ungesättigten Seitenkette.....	13
Abb. 6: Strukturen der YTXs mit Eliminierung partieller Abschnitte der ungesättigten Seitenkette und der Desulfo-YTXs .....	14
Abb. 7: Strukturen der YTXs mit Modifikation der Anzahl der Ringsysteme .....	15
Abb. 8: Derivatisierungs-Reaktion von YTX durch DMEQ-TAD .....	23

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Typische Toxin-Konzentrationen, die zu der Schließung eines Aquakulturbetriebes führen können und die bisher berichteten maximalen Toxin-Konzentrationen [20] .....	4
Tab. 2: Überblick über die DSP-Toxine, nach MILES <i>et al.</i> [29] verändert; (?) kennzeichnet nicht abschließend gesicherte Wirkmechanismen .....	5
Tab. 3: Chemische Eigenschaften der CFP-Toxine und einiger BTXs [55-65], MW=Molekulargewicht .....	7
Tab. 4: Marine Biotoxine mit neurotoxischer Wirkung, nach WANG [95] verändert .....	11
Tab. 5: Chemische Eigenschaften einiger YTXs [45, 128, 130, 132], MW=Molekulargewicht	16
Tab. 6: Übersicht über die von der "FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs" vorgeschlagenen sowie in der EU geltenden Toxin-Grenzwerte [20, 28, 173] .....	25

## 1 Einleitung

Neben den durch bakteriellen Verderb, Schwermetalle und anthropogene Rückstände induzierten Vergiftungen ist seit langem das Auftreten von Intoxikationen bekannt, welche durch marine Biotoxine hervorgerufen werden. Die Detektion der marinen Biotoxine spielt eine immer größer werdende Rolle in der Lebensmittelüberwachung.

Kommt es zu einer toxischen „Algenblüte“ („Harmful Algal Bloom“, HAB), können Fischsterben und die Gefährdung der menschlichen Gesundheit daraus resultieren. Die Toxine können sich in der Nahrungskette anreichern, werden metabolisiert und verursachen beim Verbraucher Vergiftungen, welche im Extremfall letal enden können. Vor allem in den wohlhabenden Industriestaaten kommt es u.a. durch ein gesteigertes Gesundheitsbewusstsein zu einer größeren Nachfrage nach Fisch und Meeresfrüchten, und dadurch steigt das Risiko für eine Intoxikation. Auch wird mit potentiell toxischen Algen belastetes Material durch den internationalen Handel, z.B. durch in Hochseeschiffen als Ballastwasser mitgeführtes Seewasser, weltweit verbreitet [1-4]. Dadurch können sich gebietsfremde toxische Arten als „Neobiota“ in bisher unbelasteten Ökosystemen etablieren [5-7]. Veränderungen des Klimas einhergehend mit der Erwärmung der Weltmeere und Eutrophikation schaffen bessere Wachstumsbedingungen für Mikroalgen, und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von HABs steigt [8]. Diese Faktoren tragen dazu bei, dass bisher ortstypische Vergiftungserscheinungen verstärkt global auftreten.

Gerade in einer Zeit, in der es durch globalisierte Märkte notwendig ist, die Sicherheit der Produkte bereits am Ursprungsort zu gewährleisten, werden Verfahren benötigt, die es erlauben, die verschiedenen marinen Biotoxine und deren Analoga analytisch zu erfassen. Folglich müssen Methoden entwickelt werden, die eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Toxine ermöglichen. Dies ist speziell im Hinblick auf solche Biotoxine von großer Bedeutung, die im Endprodukt wie z.B. Seafood gemeinsam vorkommen können und im Tierversuch ähnliche Symptome hervorrufen, sich jedoch hinsichtlich ihrer Wirkungsweise und der Toxizität im menschlichen Organismus unterscheiden. Daneben ist es notwendig, dass weitere Erkenntnisse bzgl. der Autökologie der Toxinproduktion gewonnen und die Mechanismen der Metabolisierung durch Schalentiere und Fische aufgeklärt werden.

## 1.1 Toxische Mikroalgen

Im Reich der Eukarya findet man toxinproduzierende Mikroalgen im Stamm der Alveolata. Neben den Diatomeen (*Pseudo-nitzschia* spp.), einigen Raphidophyten (*Heterosigma akashiwo*, *Chatonella* spp.) und Haptophyten (*Prymnesium* spp.) sind dies vor allem die Vertreter der Klasse der Dinoflagellaten (Dinophyceae) [9]. Davon werden ca. 80 Arten als potentiell toxisch eingestuft.

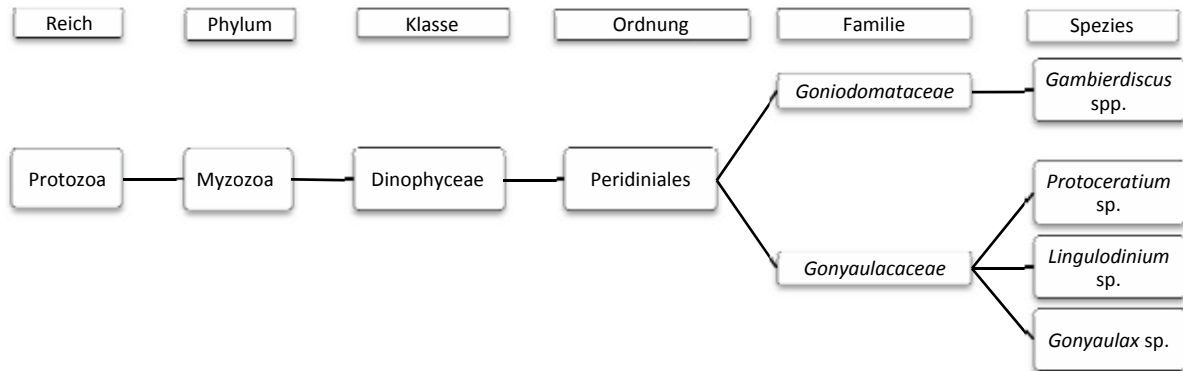


Abb. 1: Systematik der untersuchten Mikroalgen [10]

Diese Dinoflagellaten, auch Panzergeißler genannt, besitzen zwei Geißeln, deren Bewegungen zu der schraubenförmigen Schwimmbahn der Organismen führen. Ihre Morphologie ist komplex, und häufig besitzen sie eine Panzerung bestehend aus Zelluloseplatten. Die braunrote bis gelbbraune Färbung resultiert aus der Einlagerung von Pigmenten, wie dem Chlorophyll a und c, in die Alveole. Dinoflagellaten ernähren sich photoautotroph und/oder heterotroph. Sie leben im Plankton oder im Benthos und ihre Vielfalt wird durch symbiotisch lebende Dinoflagellaten vergrößert. In dieser Arbeit sind vor allem *Gambierdiscus* spp. und *Protoceratium* sp. als Polyether-produzierende Vertreter der Peridiniales von Bedeutung und werden im Anschluss näher beschrieben (vgl. Abb. 1).

### 1.1.1 Goniodomataceae

Die Gattung *Gambierdiscus* ist gekennzeichnet durch die epiphytische Lebensweise der Dinoflagellaten. Die folgenden Spezies gehören zu dieser Gattung: *G. australes* (FAUST und CHINAIN), *G. belizeanus* (FAUST), *G. pacificus* (CHINAIN und FAUST), *G. polynesiensis* (CHINAIN und FAUST), *G. toxicus* (ADACHI und FUKUYO) und *G. yasumotoi* (HOLMES, 1998) [11]. Besonders *G. toxicus* ist als Produzent der CFP-Toxine bekannt. Der gepanzerte marine Dinoflagellat vermehrt sich asexuell und ist häufig mit Makroalgen oder toten Korallen assoziiert [12].

### 1.1.2 Gonyaulacaceae

Wie auch die Saxitoxin- oder Spirolide-bildenden Dinoflagellaten der Gattung *Alexandrium* gehören alle bisher als YTXs-Produzenten identifizierten Arten zur Familie der Gonyaulacaceae. Bereits 1997 konnte *Protoceratium reticulatum* (CLAPARÈDE und LACHMANN) BÜTSCHLI als YTX-Produzent von SATAKE *et al.* (1997) identifiziert werden [13]. Bis heute wurden zwei weitere Dinoflagellaten entdeckt, die zur YTX-Produktion fähig sind. Dies sind *Lingulodinium polyedrum* (STEIN) DODGE und *Gonyaulax spinifera* (CLAPARÈDE und LACHMANN) DIESING [14-17]. *P. reticulatum* (Syn.: *Gonyaulax grindleyi*, *Peridinium reticulatum*) ist eine solitäre in temperierten Gewässern vorkommende photoautotrophe Mikroalge mit einer Länge von 28-43 µm und einer Breite zwischen 25-35 µm. Der Lebenszyklus von *P. reticulatum* ist bisher noch nicht näher untersucht worden. Es ist jedoch bekannt, dass diese Mikroalge in Notzeiten zur Bildung von dauerhaften Zysten fähig ist, welche durch die auffälligen „Spines“ (Dornen) selbst unter dem Lichtmikroskop erkennbar sind [18]. Ebenso markant ist die Retikulation der Zellen, welche namensgebend war [19].

## 1.2 Marine Polyethertoxine

Die marinen Polyethertoxine sind als chemische Substanzen in die Gruppe der Sekundärmetabolite einzuordnen, welche sich von Primärmetaboliten darin unterscheiden, dass sie nicht ubiquitär in allen Lebewesen vorkommen und das Überleben des Organismus auch ohne die Produktion dieser Stoffwechselprodukte möglich ist. So kann ein bestimmter Stamm eines Dinoflagellaten ein Toxin bilden, wohingegen in einem anderen Stamm dieses nicht vorkommt. Bis heute ist es von wissenschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse, warum die Toxizität zwischen den Stämmen variiert und auf welchen Mechanismen diese Tatsache beruht. Im Speziellen stellt sich die Frage, inwieweit die Bildung von marinen Biotoxinen von gewissen Umweltfaktoren abhängig ist.

Das Vorkommen von Toxinen in Fischereiprodukten kann zur ernsthaften Gefährdung der menschlichen Gesundheit führen. Deshalb wurden für viele Toxine Grenzwerte eingeführt. Bei einer Überschreitung der Grenzwerte dürfen die belasteten Produkte nicht vertrieben werden. Außerdem kann eine zeitweilige Schließung der Aquakultur-Betriebe angeordnet werden (vgl. Tab. 1 und Kap. 1.4.2).

Die Einteilung der marinen Biotoxine wurde aufgrund der beobachteten Symptome nach einer Intoxikation vorgenommen. Demzufolge werden die häufigsten Intoxikationen als Amnesic Shellfish Poisoning (ASP), Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP), Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) und Ciguatera Fish Poisoning (CFP) bezeichnet.

Tab. 1: Typische Toxin-Konzentrationen, die zu der Schließung eines Aquakulturbetriebes führen können und die bisher berichteten maximalen Toxin-Konzentrationen [20]

Toxin-Gruppe	Typische Toxin-Konzentrationen, die zu der Schließung eines Gebietes führen können (mg/kg)	Maximale berichtete Konzentration (mg/kg)
AZA	0.16-0.3	1.4
BTX	0.8 (as PbTx-2)	40
Zyklische Imine	0.1	2
DA	20-200	1280
OA	0.16-1	36
PTX	LOD-0.2	0.9
STX	0.8-10	800
YTX	1-2	8

Die als CFP bekannte Fischvergiftung ist die häufigste durch marine Biotoxine verursachte Erkrankung. Betroffene Personen leiden unter gastrointestinalen, neurologischen und kardiologischen Symptomen. Hervorgerufen wird CFP hauptsächlich durch den Verzehr von größeren karnivoren Fischen, wie dem Barrakuda oder dem Snapper (vgl. Kap. 1.2.2).

Im Jahr 1976 wurde in Japan zum ersten Mal über eine Vergiftung durch DSP-Toxine berichtet. Symptome waren Diarrhoe, Übelkeit, Erbrechen und abdominale Schmerzen. YASUMOTO *et al.* isolierten 1978 die Okadasäure (OA) aus dem Schwamm *Halichondria okadai*. In den folgenden Jahren wurden weitere ähnliche Toxine isoliert und in die Gruppe der DSP-Toxine eingestuft: die Dinophysistoxine (DTXs), die Pectenotoxine (PTXs), die Yessotoxine (YTXs) und die Azaspirosäuren (AZAs) [21]. Die DSP-Toxine sind hinsichtlich der chemischen Struktur eine sehr heterogene Gruppe und zeigen im klassischen Mausbioassay (MBA) allesamt toxische Effekte (vgl. Kap. 1.3.1).

OA und dessen Derivate, die Dinophysistoxine (DTXs), sind lipophile Polyethertoxine, welche durch Inhibierung der Proteinphosphatase 1 und 2A Durchfall induzieren können. Außerdem gelten sie als Tumorpromotoren [22-24].

YTX wurde bereits 1987 von MURATA *et al.* isoliert und aufgrund seiner Induktion DSP-ähnlicher Symptome im MBA in die DSP-Gruppe integriert [25]. Seit dieser Zeit wurde jedoch die Toxizität von YTX mehrfach in Frage gestellt, und der festgelegte Grenzwert wurde

schließlich korrigiert [26, 27]. Allerdings ist bis heute die Wirkungsweise des Toxins nicht eindeutig geklärt, so dass nach wie vor Handlungsbedarf hinsichtlich der Regulierung von YTXs besteht (vgl. Tab. 2, Kap. 1.2.6 und 1.4) [28].

Tab. 2: Überblick über die DSP-Toxine, nach MILES *et al.* [29] verändert; (?) kennzeichnet nicht abschließend gesicherte Wirkmechanismen

Vertreter	Chemische Eigenschaften	Produzenten	Vorkommen	Mechanismus der Wirkung	Symptome
OA; DTX	Lipophil, lineare Polyether	<i>Dinophysis</i> spp., <i>Prorocentrum</i> spp. [30, 31]	Schalentiere	Inhibition der Phosphatasen 1 und 2A	Entzündung des GIT, Diarrhoe, Tumorpromoter [22-24]
YTX	Lipophil, makrozyklisch Polyether (ähnlich dem BTX und CTX)	<i>Protoceratium</i> sp., <i>Lingulodinium</i> sp., <i>Gonyaulax</i> sp. [16]	<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>M. edulis</i>	spannungsabh. Ca <sup>2+</sup> -Kanal (?) [32], Neurotoxizität (?) [33]	Beim Menschen keine bekannt
PTX	Lipophil, Polyether-Lactone	<i>Dinophysis</i> spp. [34]	<i>Patinopecten yessoensis</i> , <i>Perna canalicus</i> , <i>M. galloprovincialis</i>	noch nicht geklärt [22]	Hepatotoxisch [34]
AZA	N-enthaltende Polyether [35, 36]	<i>Azadinium</i> sp. [37-40]	<i>M. edulis</i> , <i>P. maximus</i> [41]	Modifizierung des Ca <sup>2+</sup> -Spiegel (?); Anstieg intrazell. cAMP [42, 43]	Diarrhoe, neurologische Symptome [46, 48]

Pectenotoxine sind lipophile makrozyklische Polyether, welche durch die gemeinsame Extrahierbarkeit mit OA und DTXs und vergleichbarer Toxizität im MBA zur DSP-Gruppe gezählt werden. Allerdings führen sie beim Menschen nicht zur Induktion von Durchfall, stehen dafür aber im Verdacht, hepatotoxisch zu wirken [34].

Im Jahr 1995 wurde in den Niederlanden erstmals über Vergiftungsfälle berichtet, bei denen die Betroffenen nach dem Verzehr von Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) aus Irland von Symptomen berichteten, die denen der DSP-Toxine glichen. Die Konzentrationen von OA und DTXs lagen jedoch unter dem Grenzwert [22, 41, 44-46]. Später konnte die Azaspirosäure (AZA)-1 aus den Muscheln isoliert und charakterisiert werden [47]. Die Toxingruppe der AZAs führt zu gastrointestinalen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Krämpfen und zu starken Kopfschmerzen. Die hervorgerufenen neurotoxischen Störungen sowie das Fehlen der Flüssigkeitsansammlung im MBA unterscheidet die Wirkung der AZAs jedoch von den für die OA-Gruppe typischen Symptomen [46, 48]. Die eindeutige Bestimmung des Produzenten bereitete Schwierigkeiten. So galt bis 2009 der heterotrophe Dinoflagellat *Protoperidinium*

*crassipes* als Produzent der AZAs. Kürzlich wurde jedoch ein sehr kleiner Vertreter der Dinoflagellaten, *Azadinium spinosum*, als Produzent von TILLMANN *et al.* identifiziert [37-40].

Die Einteilung aufgrund der klinischen Symptome wurde viele Jahre als sinnvoll erachtet. Im Jahr 2004 wurde jedoch eine neue Klassifizierung auf einer gemeinsamen Konferenz der FAO, des IOC und der WHO vorgeschlagen. Danach sollen die marinen Biotoxine nunmehr aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in die Gruppen der AZAs, der Brevetoxine (BTXs), der Zyklische Imine, der Domoinsäure (DA), der OA (einschließlich DTXs), der PTXs, des Saxitoxins (STX) und der YTXs eingeteilt werden [20].

Die zu den Polyethern gehörenden Toxine können ihrerseits nach der Struktur in mehrere Gruppen eingeteilt werden. CTXs, YTXs und BTXs gehören zu den leiterförmigen Polyethertoxinen, OA und DTXs sind lineare und PTXs stellen makrozyklische Polyether dar. Die AZAs zeichnen sich durch ihre besondere Struktur aus, ihr Spiro-Ring enthält ein heterozyklisches Amin und einen aliphatischen Carboxylsäure-Rest (vgl. Tab. 2) [20, 28, 35, 36].

### 1.2.1 Leiterförmige Polyether-Toxine

In der vorliegenden Arbeit wurden die marinen Biotoxine CTX und YTX sowie deren Analoga untersucht. Im Folgenden soll auf die chemischen Eigenschaften, die Wirkungsweise, das Vorkommen, analytische Detektionsverfahren und die lebensmittelrechtliche Relevanz näher eingegangen werden. Außerdem werden marine Biotoxine vorgestellt, deren Eigenschaften und/oder Wirkungsweisen Ähnlichkeiten mit denen der beiden untersuchten Toxin-Gruppen aufweisen.

### 1.2.2 Ciguatera-Fish-Poisoning (CFP)-Toxine

Mit der Identifizierung von *Gambierdiscus toxicus* als CTXs-produzierendem Dinoflagellaten (vormals als *Diplopsalis* sp. bezeichnet) wurden die Bildung, Anreicherung und Metabolisierung der CFP-Toxine seit den 1970er Jahren verstärkt untersucht [49]. Da die Gattung *Gambierdiscus* epiphytisch auf Makroalgen lebt und von herbivoren Fischen gefressen wird, können sich die CTXs in der Nahrungskette anreichern. Sie können in Raubfischen in besonders hohen Konzentrationen vorkommen und rufen bei kontaminierten



Fischen auch in höheren Konzentrationen selten erkennbare Schäden hervor. Beim Menschen hingegen können CTXs zu ernsthaften Vergiftungen führen, welche in einigen seltenen Fällen sogar letal verlaufen. Bestimmte Umweltbedingungen, wie das El Niño-Phänomen oder Korallensterben, erhöhen die Risiken für ein Ausbrechen von Ciguatera-Fällen [50, 51]. Weltweit treten jährlich 10 000-50 000 CFP-Fälle auf, wobei vermutet wird, dass nur ein geringer Teil der Intoxikationen erfaßt wird [50-54]. Zusammen mit weiteren Ciguatoxin-Kongeneren konnten Maitotoxin (MTX), Gambiersäuren (GAs) und Gambierol aus *G. toxicus* isoliert werden [55]. Diese auch als Gambiertoxine (GT) bezeichneten Vorläufertoxine werden in herbivoren und carnivoren Fischen metabolisiert, wodurch in Fischen weitere CTX-Analoga identifiziert werden können (vgl. Tab. 3) [53, 54].

Tab. 3: Chemische Eigenschaften der CFP-Toxine und einiger BTXs [55-64], MW=Molekulargewicht

Name	Summenformel	MW (g mol <sup>-1</sup> )
P-CTX-1 (CTX, CTX-1B)	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> O <sub>19</sub>	1111
P-CTX-2 (52-epi P-CTX-3)	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> O <sub>18</sub>	1094
P-CTX-3	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> O <sub>18</sub>	1094
<i>P-CTX-3C*</i>	C <sub>57</sub> H <sub>82</sub> O <sub>16</sub>	1045
2,3-dihydroxy P-CTX-3C (CTX-2A1)	C <sub>57</sub> H <sub>84</sub> O <sub>18</sub>	1057
51-hydroxy P-CTX-3C	C <sub>57</sub> H <sub>82</sub> O <sub>17</sub>	1039
<i>(P)-CTX-4A (52-epi GT-4B)*</i>	C <sub>60</sub> H <sub>85</sub> O <sub>15</sub>	1061
<i>(P)-CTX-4B (GT-4B)*</i>	C <sub>60</sub> H <sub>85</sub> O <sub>15</sub>	1061
C-CTX-1	C <sub>62</sub> H <sub>92</sub> O <sub>19</sub>	1141
C-CTX-2 (56-epi C-CTX-1)	C <sub>62</sub> H <sub>92</sub> O <sub>19</sub>	1141
I-CTX-1	C <sub>62</sub> H <sub>92</sub> O <sub>19</sub>	1141
I-CTX-2	C <sub>62</sub> H <sub>92</sub> O <sub>19</sub>	1141
MTX	C <sub>164</sub> H <sub>256</sub> O <sub>68</sub> S <sub>2</sub>	3376
GA-A	C <sub>59</sub> H <sub>92</sub> O <sub>16</sub>	1057
GA-B	C <sub>60</sub> H <sub>94</sub> O <sub>16</sub>	1071
GA-C	C <sub>65</sub> H <sub>100</sub> O <sub>19</sub>	1184
GA-D	C <sub>66</sub> H <sub>102</sub> O <sub>19</sub>	1198
Gambierol	C <sub>43</sub> H <sub>64</sub> O <sub>11</sub>	756
PbTX-1	C <sub>49</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	867
PbTX-2	C <sub>50</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	895

\* Gambiertoxine (GT)

*kursiv* = von *Gambierdiscus* spp. produziert

### 1.2.2.1 Struktur der Ciguatoxine (CTXs)

P-CTX-1 ist ein lipophiles, hitze- und säurestabiles, leiterförmiges Toxin mit zyklischer Polyetherstruktur und wurde 1967 erstmals isoliert [65, 66]. Die Summenformel von P-CTX-1 lautet C<sub>60</sub>H<sub>89</sub>O<sub>19</sub> und die Struktur enthält 13 Polyetherringe. Aus *Gambierdiscus* spp. isolierte Vorläufertoxine sind weniger polar als die aus Raubfischen isolierten Analoga [67, 68].

Neben den Haupttoxinen finden sich auch diverse Minor-Kongenere, welche die Vielzahl der bekannten CTXs noch erhöhen (vgl. Tab. 3 und Abb. 2 und 3).

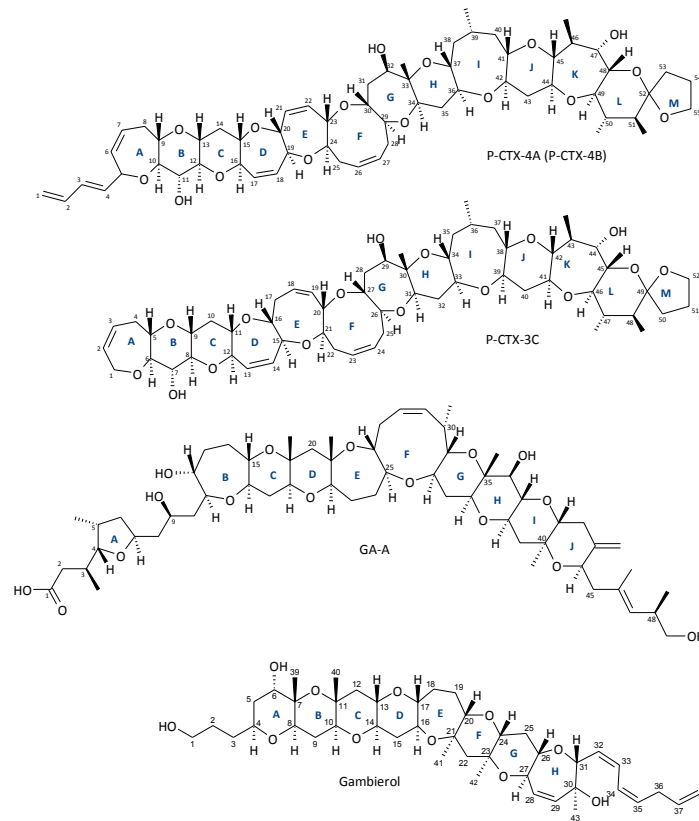


Abb. 2: Chemische Struktur der von *Gambierdiscus* spp. produzierten marinen Polyethertoxine

### 1.2.2.2 Vorkommen und Verbreitung der CTXs

Die, wie in Kap. 1.1.1 bereits beschrieben, ebenfalls von Dinoflagellaten produzierten CTXs, werden in Regionen rund um den Äquator gefunden, und dabei kommt die Spezies *G. toxicus* im Pazifischen Ozean, im Indischen Ozean und in der Karibik vor. Neuerdings muss die bisher geltende räumliche Eingrenzung des Vorkommens von *Gambierdiscus* spp. von 35 °N bis 35 °S erweitert werden, denn es existieren Publikationen über CFP-Ausbrüche nahe der Kanarischen Inseln durch mit C-CTX-1 belastete Fische. Außerdem wurde eine Studie über das Vorkommen von *Gambierdiscus* spp. im Mittelmeer veröffentlicht, wobei hier jedoch nicht über Intoxikationen durch mit CFP-Toxinen belastete Speisefische berichtet wurde [69-73]. Je nach Ursprungsgebiet konnten verschiedene CTX-Analoga in den Fischarten detektiert werden. Nach ihrer Herkunft unterscheidet man zwischen pazifischen CTXs (P-CTXs), karibischen CTXs (C-CTXs) und indischen CTXs (I-CTXs), welche sich nicht nur

strukturell unterscheiden, sondern auch bzgl. der Symptome bei den betroffenen Personen (vgl. Kap. 1.2.4, Abb. 3).

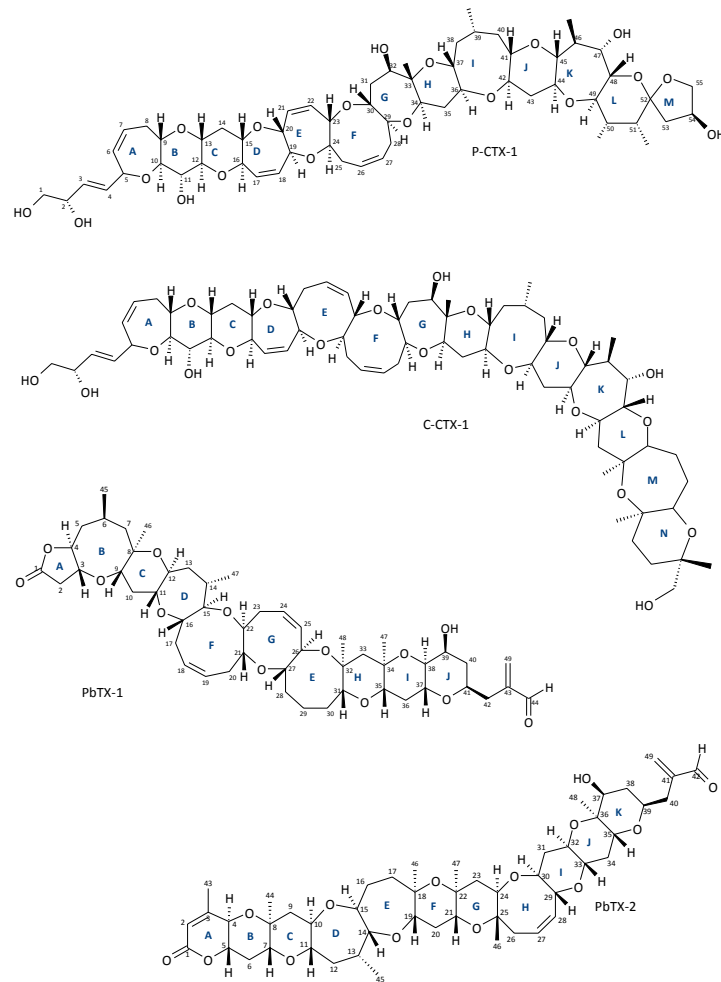


Abb. 3: Chemische Struktur der marinen Polyethertoxine P-CTX-1, C-CTX-1, PbTX-1, PbTX-2

### 1.2.3 Brevetoxine (BTXs)

Im Golf von Mexico und an der Ostküste Floridas werden alljährlich Algenblüten von *Karenia brevis* (DAVIS, 1948) G. HANSEN und MOESTRUP, 2000 (Syn.: *Gymnodinium breve*, *Ptychodiscus brevis*) beobachtet, und daraus resultierend kommt es zum Sterben von Fischen, Meeressäugern und Seevögeln sowie zu Intoxikationen des Menschen [74, 75]. Hervorgerufen wird die Vergiftung durch BTXs, einem den CTXs und YTXs strukturell ähnlichem methylierten Polyethertoxin (vgl. Abb. 3). Die neurotoxische Wirkung dieser Polyethertoxine beruht ebenfalls auf einer andauernde Aktivierung der Natrium ( $\text{Na}^+$ )-Kanäle [76-79]. Die Folgen sind Übelkeit, Gefühllosigkeit, Muskelschmerzen und ein Verlust der motorischen Kontrolle [74, 76, 80, 81].

### 1.2.4 Wirkmechanismus von CTXs und BTXs

CTXs sowie BTXs und Gambierol binden spezifisch an die  $\alpha$ -Untereinheit von spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanälen ( $\text{Na}_v$ -Kanäle), welche als Glykoproteine in erregbaren Membranen bestimmter Gewebe, wie dem Herz, den Neuronen und der Muskulatur, vorliegen [56, 79, 82-87]. Der  $\text{Na}_v$ -Komplex besteht aus einer  $\alpha$ - und einer oder mehreren  $\beta$ -Untereinheiten. Die für die Funktion der  $\text{Na}_v$ -Kanäle essentielle  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus vier Transmembrandomänen, welche wiederum aus sechs Transmembransegmenten zusammengesetzt sind und in der Tertiärstruktur die Pore des  $\text{Na}_v$ -Kanals bilden (vgl. Abb. 4).

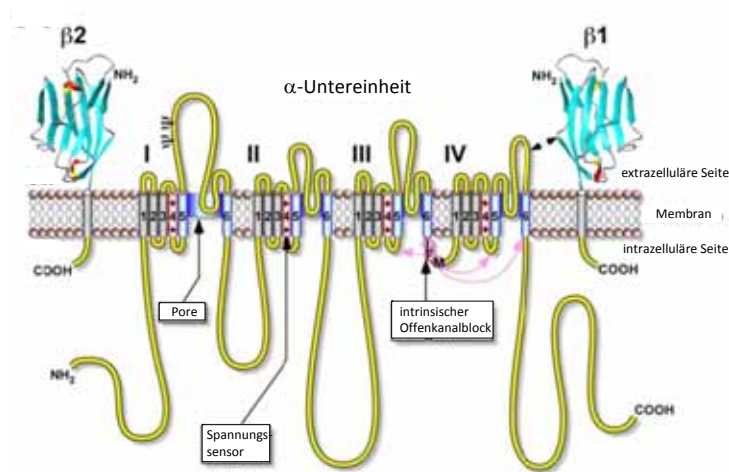


Abb. 4: Modell der Sekundärstruktur des  $\text{Na}_v$ -Komplexes, die Segmente S4 vermitteln als Spannungssensoren bei Depolarisation die Öffnung des Kanals, das IFM-Peptid blockiert nach Aktivierung die offene Pore und führt zur Schließung des aktivierten Kanals, nach NICHOLSON verändert (2006) [56, 88]

Im physiologischen Zustand ermöglichen diese Kanäle nach ihrer Aktivierung den selektiven Durchtritt von Ionen durch die Membran, und damit das Entstehen und die Weiterleitung eines Aktionspotentials. Das Binden der Toxine führt zu einer Verschiebung des zur Anregung notwendigen Aktionspotentials in Richtung eines höheren negativen Potentials. Außerdem wird die Inaktivierung des  $\text{Na}_v$ -Kanals verhindert, was zu einem anhaltenden  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die Zelle führt. Infolgedessen kommt es zu einer andauernden Aktivierung der Zelle [23, 56, 77, 87, 89, 90, 91]. Beim Menschen resultieren daraus Muskel- und Gelenkschmerzen, Erbrechen, Diarrhoe sowie verschiedene neurologische und kardiologische Symptome (vgl. Tab. 4). Außerdem kommt es zu dem durch Ciguatera-Toxine hervorgerufenen umgekehrten Temperaturempfinden, wobei die Symptome in Abhängigkeit von der Ursprungsregion des verzehrten Speisefisches unterschiedlich stark sein können [54,

92, 93]. Im Pazifik finden sich hauptsächlich neurologische Beeinträchtigungen, während in der Karibik vorrangig gastrointestinale Störungen auftreten [94].

Tab. 4: Marine Biotoxine mit neurotoxischer Wirkung, modifiziert nach WANG [94] verändert

Toxine	Target/Mechanismus	Symptome/Anwendung	Produzenten
<b>CTXs</b>	spannungsabh. Na <sup>+</sup> -Kanal (Site 5) – dauerhafter Na <sup>+</sup> -Einstrom [87, 90, 95]	Gastrointestinale Störungen, neurologische Symptome, kardiologische Symptome [96]	<i>Gambierdiscus</i> spp. [49]
MTX	spannungsabh. Ca <sup>2+</sup> -Kanal [97]	Im MBA hochtoxisch, MTX wird jedoch nicht in Carnivoren akkumuliert	
Gambierol	vgl. CTX [98]	Neurologische Symptome vergleichbar zu CTX	
GA		Potentes Antimykotika [61, 62]	
<b>BTXs</b>	vgl. CTX [99]	Gastrointestinale Störungen, Hypotension, Arrhythmien, Taubheit und Kribbeln, Bronchial-Konstriktion, Irritation des oberen und des unteren Respirationstraktes [74, 100]	<i>Karenia</i> sp., <i>Chatonella</i> spp. [101], <i>Fibrocapsa</i> sp., <i>Heterosigma</i> sp. [102]
Brevenal	Kompetitive Hemmung von BTX [103]	Nicht toxisch, bewahrt Fische vor der toxischen Wirkung des BTX [103]	
<b>STX und GTX</b>	spannungsabh. Na <sup>+</sup> -Kanal (Site 1) - Na <sup>+</sup> -Einstrom verhindert [104, 105]	Neuromuskuläre Paralyse	<i>Alexandrium</i> spp., <i>Gymnodinium</i> spp., <i>Pyrodinium</i> spp [31]
<b>AZAs</b>	Modifizierung des Ca <sup>2+</sup> -Spiegel (?), Anstieg intrazell. cAMP [42, 43]	Symptome beim Menschen vorrangig gastrointestinal; aber auch lymphat. Gewebe und Leber sind betroffen [106]	<i>Azadinium</i> sp. [37-40]
<b>YTXs</b>	Modifizierung des Ca <sup>2+</sup> -Spiegel [32]	Neurotoxizität [33]	<i>P. reticulatum</i> , <i>L. polyedrum</i> , <i>G. spinifera</i> [14-17]

### 1.2.5 Yessotoxine (YTXs)

YTX wurde erstmals von MURATA *et al.* (1987) aus Verdauungsorganen der Kammuschel (*Patinopecten yessoensis*) isoliert [25]. Aufgrund von Untersuchungen mittels MBA wurde YTX zunächst in die Gruppe der DSP-Toxine eingegliedert. Bei YTX-Gabe des Extraktes intraperitoneal (i.p.) starben die Mäuse nach einer mit anderen DSP-Toxinen vergleichbaren Zeit. YTX verursachte jedoch, im Gegensatz zu OA und DTXs keine Flüssigkeitsansammlung im intestinalen Gewebe. Auch wurde erst Jahre später erkannt, dass YTX oral verabreicht etwa zehnmal weniger toxisch ist. Allerdings zeigten die veröffentlichten Ergebnisse auch erstmals die schädigende Wirkung auf verschiedene Organe, wie z.B. das Herz [27].

Die YTX-Konzentrationen in Dinoflagellaten unterliegen relativ starken Schwankungen. Nach HOWARD *et al.* (2008) betragen sie zwischen 0.005 und 200 pg/Zelle [107]. Nach RHODES *et al.* (2006) liegt der YTX-Gehalt von *P. reticulatum* maximal bei 79 pg/Zelle, somit deutlich unter den in *G. spinifera* detektierten Konzentrationen von bis zu 200 pg/Zelle [16, 107, 108].

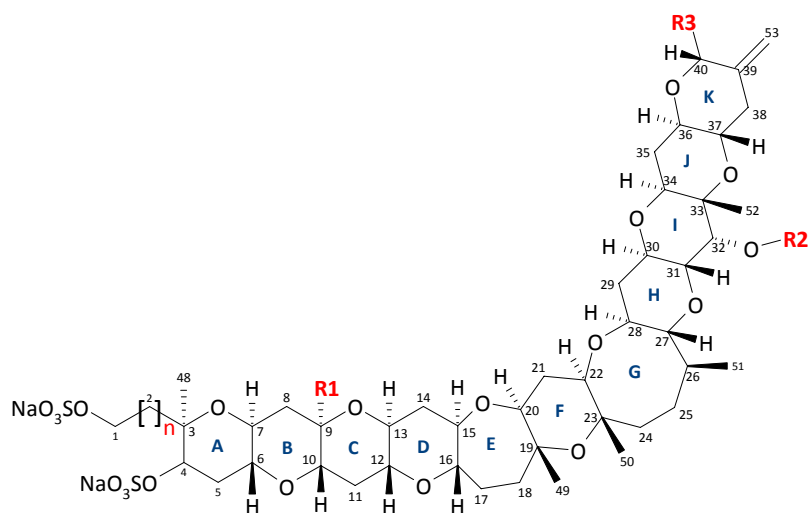
Einige Arbeitsgruppen diskutieren auch eine je nach Kultivierungsbedingungen mengenmäßig bedeutende Abgabe von YTX in das Nährmedium, wobei u.a. die amphotere Struktur des YTX als Grund genannt wurde [18, 109, 110]. Im Phytoplankton kann neben YTX eine Vielzahl von YTX-Analoga vorkommen [29, 111]. Nach KROCK *et al.* (2006) besteht das Toxinprofil von *P. reticulatum* vor allem aus YTX, und in der Nordsee liegt zu 99 % YTX vor [112].

#### 1.2.5.1 Struktur von YTX und dessen Analoga

Die absolute Konfiguration von YTX wurde 1996 aufgeklärt [113]. YTX ist ein leiterförmiges, polyzyklisches, etherhaltiges Toxin mit zwei Sulfatgruppen und einer aus 9 C-Atomen bestehenden ungesättigten Seitenkette [25, 45, 114, 115]. Die Molekularformel des Natriumsalzes lautet  $C_{55}H_{82}O_{21}S_2Na_2$  (vgl. Abb. 5) [25].

Von den Dinoflagellaten werden neben YTX auch diverse YTX-Analoga gebildet, welche im höheren Organismus angereichert sowie metabolisiert werden. Somit ergibt sich eine enorme Anzahl möglicher YTX-Analoga (vgl. Tab. 5) [29, 45, 116, 117]. Bis heute wurden mehr als 90 unterschiedliche Abkömmlinge beschrieben, jedoch konnten viele Strukturen bisher nicht vollständig charakterisiert werden [118]. Die häufigsten Modifikationen am YTX-Rückgrat sind:

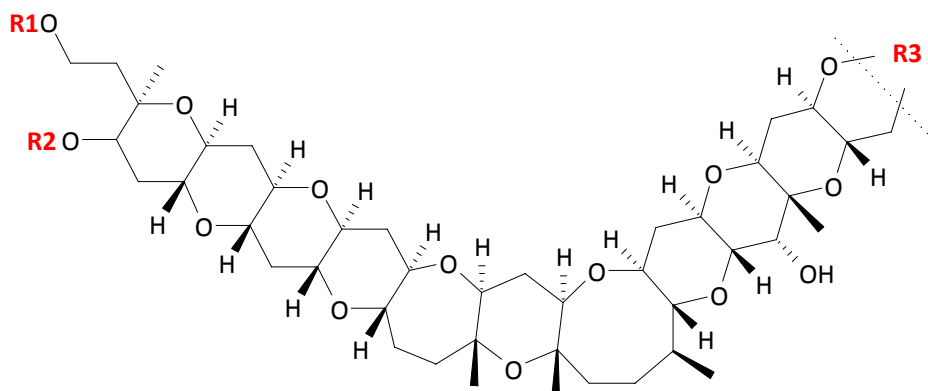
- die ungesättigte Seitenkette kann modifiziert vorliegen; durch Carboxylierung (z.B. COOH YTX), Hydroxilierung (z.B. 45-OH YTX), Addition von Amidon (z.B. das trihydroxilierte Amid von 41a-homo YTX) sowie durch Eliminierung verschiedener Abschnitte (z.B. trinor YTX);
- zwischen C-1 und C-2 kann eine  $CH_3$ -Gruppe eingefügt sein (z.B. 1a-homo YTX);
- ebenfalls kann eine  $CH_3$ -Gruppe zwischen C-41 und C-42 eingefügt sein (z.B. 41a-homo YTX);
- C-9 kann methyliert vorliegen (9-Me-41a homo YTX);
- C-32 kann glykosiliert vorliegen (z.B. 32-arabinofuranosyl YTX);
- Ring A kann fehlen (nor ring A YTX);
- Desulfonierung an C-1 und C-4 (z.B. 1-ds YTX) und
- Variationen der eben aufgezählten Modifikationen [29, 119-126].



YTX

Name	n	R1	R2	R3
YTX	1	H	H	
45-OH YTX	1	H	H	
44,55-di OH YTX	1	H	H	
COOH YTX	1	H	H	
1a-homo YTX (Protoceratin I)	2	H	H	
45-OH homo YTX	2	H	H	
41a-homo YTX	1	H	H	
9-Me-41a-homo YTX	1	CH <sub>3</sub>	H	
arabinofuranosyl YTX	1	H		
Protoceratin II	2	H		
diarabinofuranosyl YTX	1	H		
Protoceratin III	2	H		
41a-homo YTX amide	1	H	H	

Abb. 5: Strukturen ausgewählter YTXs mit Modifikationen am C-9, C-32 und der ungesättigten Seitenkette



Name	R1	R2	R3
45,46,47 trinor YTX	SO <sub>3</sub> Na	SO <sub>3</sub> Na	
41-keto YTX (heptanor-41 oxo YTX)	SO <sub>3</sub> Na	SO <sub>3</sub> Na	
40- <i>epi</i> 41-keto YTX (heptanor-41 oxo YTX)	SO <sub>3</sub> Na	SO <sub>3</sub> Na	
41-keto YTX 1,3enone	SO <sub>3</sub> Na	SO <sub>3</sub> Na	
1-desulfo YTX	H	SO <sub>3</sub> Na	
4-desulfo YTX	SO <sub>3</sub> Na	H	
1,4-desulfo YTX	H	H	

Abb. 6: Strukturen der YTXs mit Eliminierung partieller Abschnitte der ungesättigten Seitenkette und der Desulfo-YTXs



Weiterhin existieren YTX-Analoga, welche sich bzgl. der Anzahl der Ringsysteme von den anderen YTXs unterscheiden. So wurde z.B. ein Analogon charakterisiert, welches sich durch die Abwesenheit des Ring A auszeichnet (nor ring A YTX) [119]. Aus Muscheln der Adria wurde ein weiteres YTX-ähnliches Toxin isoliert. Die Struktur der als Adriatoxin (ATX) bezeichneten Substanz ist von Ring A bis Ring J mit YTX identisch, jedoch fehlt Ring K inklusive der ungesättigten Seitenkette. Außerdem ist C-36 hydroxyliert, und C-37 besitzt eine dritte Sulfatgruppe [127]. Da in der Vergangenheit keine dem ATX ähnlichen Analoga aus Dinoflagellaten isoliert werden konnten, wurde angenommen, dass ATX in Schalentieren durch Metabolisierung entsteht, jedoch konnte kürzlich eine dem ATX strukturell ähnliche Substanz - ATX B - aus *P. reticulatum* isoliert werden (vgl. Abb. 7 und Kap. 1.2.6) [128, 129].

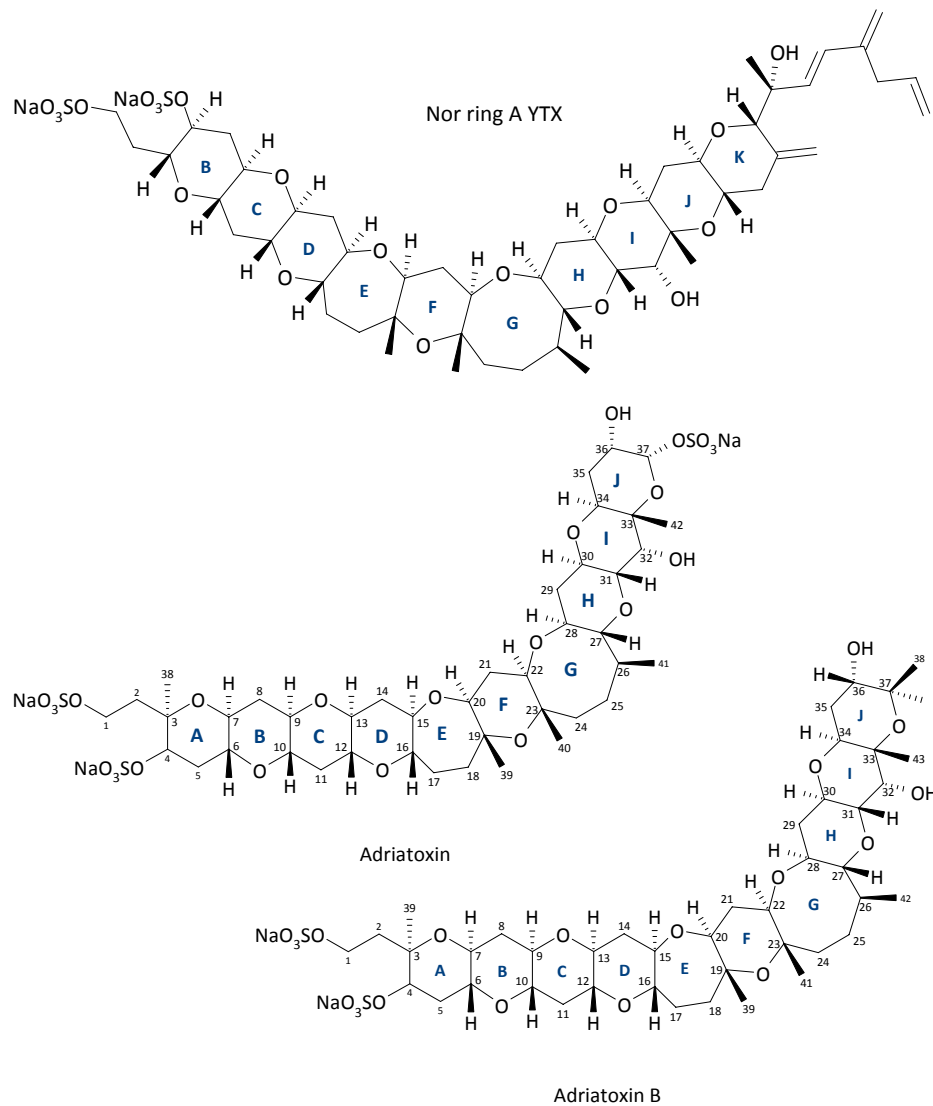


Abb. 7: Strukturen der YTXs mit Modifikation der Anzahl der Ringsysteme

Tab. 5: Chemische Eigenschaften einiger YTXs [45, 125, 127, 129], MW=Molekulargewicht

Name	Summenformel	MW (g mol <sup>-1</sup> )	UV (nm)
ATX B	C <sub>43</sub> H <sub>68</sub> O <sub>20</sub> S <sub>2</sub>	952	-
Keto nor A ring YTX,	C <sub>45</sub> H <sub>68</sub> O <sub>20</sub> S <sub>2</sub>	992	-
40-epi keto nor A ring YTX	C <sub>45</sub> H <sub>68</sub> O <sub>20</sub> S <sub>2</sub>	992	-
Nor A ring YTX enone	C <sub>45</sub> H <sub>68</sub> O <sub>20</sub> S <sub>2</sub>	992	-
Keto YTX (heptanor 41 oxo YTX)	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	1048	-
40-epi keto YTX	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	1048	-
keto YTX enone	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	1048	273
ATX	C <sub>42</sub> H <sub>66</sub> O <sub>24</sub> S <sub>3</sub>	1050	-
1-ds YTX	C <sub>55</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub> S	1062	-
Keto 1a-homo YTX	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	1062	-
9-Me-YTX enone	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	1062	273
Nor ring A YTX	C <sub>52</sub> H <sub>78</sub> O <sub>20</sub> S <sub>2</sub>	1086	239
45,46,47-trinor YTX	C <sub>52</sub> H <sub>78</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	1102	226
1-ds COOH YTX	C <sub>56</sub> H <sub>83</sub> O <sub>20</sub> S	1108	-
4-ds COOH YTX	C <sub>56</sub> H <sub>83</sub> O <sub>20</sub> S	1108	-
44-oxotrinor YTX	C <sub>52</sub> H <sub>78</sub> O <sub>22</sub> S <sub>2</sub>	1118	230
45-OH-dinor YTX	C <sub>53</sub> H <sub>80</sub> O <sub>22</sub> S <sub>2</sub>	1132	230
41a-homo-44-oxotrinor YTX	C <sub>53</sub> H <sub>80</sub> O <sub>22</sub> S <sub>2</sub>	1132	-
<b>YTX</b>	<b>C<sub>55</sub>H<sub>82</sub>O<sub>21</sub>S<sub>2</sub></b>	<b>1142</b>	<b>230</b>
41a-homo YTX	C <sub>56</sub> H <sub>84</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	1156	239
1a-homo YTX	C <sub>56</sub> H <sub>84</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	1156	231
45-OH YTX	C <sub>55</sub> H <sub>82</sub> O <sub>22</sub> S <sub>2</sub>	1158	230
9-Me-41a-homo YTX	C <sub>57</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	1170	239
45-OH-1a-homo YTX	C <sub>56</sub> H <sub>84</sub> O <sub>22</sub> S <sub>2</sub>	1172	-
COOH YTX	C <sub>55</sub> H <sub>82</sub> O <sub>23</sub> S <sub>2</sub>	1174	-
44,55-diOH YTX	C <sub>55</sub> H <sub>84</sub> O <sub>23</sub> S <sub>2</sub>	1176	205
COOH-1a-homo YTX	C <sub>56</sub> H <sub>84</sub> O <sub>23</sub> S <sub>2</sub>	1188	-
44,55-diOH-41a-homo YTX	C <sub>56</sub> H <sub>86</sub> O <sub>23</sub> S <sub>2</sub>	1190	205
45-OH COOH YTX	C <sub>55</sub> H <sub>82</sub> O <sub>24</sub> S <sub>2</sub>	1190	-
44,55-di OH-9-Me-41a-homo YTX	C <sub>57</sub> H <sub>88</sub> O <sub>23</sub> S <sub>2</sub>	1204	205
32-arabioside YTX	C <sub>60</sub> H <sub>90</sub> O <sub>25</sub> S <sub>2</sub>	1274	-
32-arabioside 1a-homo YTX	C <sub>61</sub> H <sub>92</sub> O <sub>25</sub> S <sub>2</sub>	1288	-
41a-homo YTX amide	C <sub>60</sub> H <sub>93</sub> O <sub>25</sub> NS <sub>2</sub>	1291	233
9-Me-41a-homo YTX amide	C <sub>61</sub> H <sub>95</sub> O <sub>25</sub> NS <sub>2</sub>	1305	233
32-diarabioside YTX	C <sub>65</sub> H <sub>98</sub> O <sub>29</sub> S <sub>2</sub>	1406	-
32-diarabioside 1a-homo YTX	C <sub>66</sub> H <sub>100</sub> O <sub>29</sub> S <sub>2</sub>	1420	230
32-tri- arabioside YTX	C <sub>70</sub> H <sub>106</sub> O <sub>33</sub> S <sub>2</sub>	1538	-
32-tri- arabioside 1a-homo YTX	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> O <sub>33</sub> S <sub>2</sub>	1552	-

### 1.2.5.2 Vorkommen und Verbreitung der YTXs

YTX wurde erstmals in Japan detektiert, und danach auch in Muscheln und/oder Phytoplankton aus Neuseeland, Norwegen, Großbritannien, Kanada, den USA, Chile, Spanien, Italien und Afrika gefunden [25, 110, 112, 117, 130]. Trotz der weltweiten Verbreitung von YTXs wurde aber festgestellt, dass viele YTX-Analoga nur lokal begrenzt vorkommen. So konnte man ATX bisher nur im Mittelmeer nachweisen, und in der Nordsee wurde im Rahmen einer Katalogisierung der Diatomeen und Dinoflagellaten der Helgoländer Reede *P. reticulatum* dokumentiert [127, 131, 132].

### 1.2.6 Wirkmechanismus der YTXs

Untersuchungen bzgl. der Toxizität von YTXs ergaben zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Auch der Wirkmechanismus am scheinbaren Hauptangriffsort, dem Herzen, ist noch nicht geklärt [133]. Als gesichert gilt jedoch, dass YTX die Proteinphosphatasen 1 und 2A nicht beeinflusst [134, 135]. Dagegen scheint YTX den Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Spiegel im Zytosol zu beeinflussen. DE LA ROSA *et al.* (2001) sehen als Ursache hierfür eine Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Durch Veränderung des 3'-5'-zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP) gelangt extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle. Es kommt jedoch auch zu einer Inhibierung des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritts [32, 136, 137]. Weiterhin wurde berichtet, dass YTX die Phosphodiesterase (PDE)-Aktivität erhöht und somit die intrazelluläre cAMP-Konzentration verringert [138, 139]. Andere Studien berichten über eine durch die Zerstörung des Zytoskeletts induzierte Apoptose, die wahrscheinlich durch Tensin<sup>1</sup>-Cleavage verursacht wird [33, 140].

Auch eine durch YTX induzierte Störung des E-Cadherin<sup>2</sup>-Catenin-Systems in epithelialen Zellen wurde kürzlich durch *in vitro* Studien nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei YTX-Exposition ein 100 kDa großes E-Cadherin-Fragment (ECRA<sub>100</sub>) in der Zelle akkumuliert [141, 142]. Andererseits scheint es, dass YTX bei oraler Gabe im Colon eine Stabilisierung des Cadherin-Proteins hervorruft [143].

Auf der Suche nach antitumorwirksamen Komponenten fielen *P. reticulatum*-Stämme durch die Produktion von Substanzen auf, welche zytotoxisch auf menschliche Tumorzelllinien wirkten. Die Protoceratin I, II, III und IV genannten Substanzen wurden als 1a-homo YTX und als Di-, Mono- und Triarabinofuranosyl von 1a-homo YTX identifiziert [144].

OGINO *et al.* (1997) wiesen in einem Versuch, in dem YTX neben bidesulfatiertem YTX (di-ds YTX) untersucht wurde, nach, dass das YTX nicht toxisch auf Fische wirkt, während di-ds YTX zum Tod der untersuchten Fische führte [135]. Im menschlichen Organismus scheint di-ds YTX die Leber und das Pankreas zu schädigen und dort Fett-Degeneration zu induzieren [133].

---

<sup>1</sup> Tensin ist eine Komponente der Fokalkontakte der Zelle. An diesen Kontaktstellen heften sich Zellen über Integrin-Rezeptoren an die extrazelluläre Matrix an.

<sup>2</sup> Cadherine sind als kalziumregulierte Zelladhäsionsmoleküle für die Vermittlung homophiler Zellkontakte von Bedeutung und Störungen spielen eine Rolle in der Metastasierung

### 1.3 Verfahren zur Bestimmung von CTXs und YTXs

Das mögliche Vorkommen der marinen Biotoxine CTXs und YTXs in marinen Organismen stellt eine potentielle Gefährdung für die menschliche Gesundheit dar. Deshalb wurden weltweit spezielle Hygienevorschriften erlassen, die den Verbraucher vor dem Verzehr mit marinen Biotoxinen belasteten Lebensmitteln schützen sollen. Gleichzeitig erfolgte in den letzten Jahren verstärkt die Entwicklung neuer, sensibler Methoden zum Nachweis dieser Toxine, um die Konsumenten von Seafood vor Intoxikationen besser schützen zu können. Allerdings gilt lt. EU-Verordnung (EG) Nr. 853/2004 nach wie vor der MBA als Standard-Methode für die Testung auf lipophile Toxine, wie z.B. auf YTXs [20]. Für die Kontrolle des Vorkommens von CTXs wird in dieser Verordnung jedoch keine Analysenmethode beschrieben, sondern es ist lediglich das Verbot des Inverkehrbringens von mit CTXs kontaminierten Fischen festgelegt worden (vgl. Kap.1.4.2).

#### 1.3.1 *in vivo*-Verfahren

Zur Bestimmung von YTXs in Schalentieren mittels MBA wird das von den Schalen befreite Probenmaterial nach YASUMOTO *et al.* (1978) mit Aceton extrahiert und der Überstand i.p. in Mäuse injiziert, welche im Anschluss 24 h unter Beobachtung stehen. Da bei Anwendung dieser Methode alle lipophilen Biotoxine gemeinsam extrahiert werden, kann es, falls mehrere Toxine in der Probe vorkommen, zu Co-Extraktionen kommen. Wegen der unterschiedlichen Toxizität der zu den DSP-Toxinen zählenden Verbindungen, können nach der Testung dieser Extrakte im Tierversuch falsche Ergebnisse erhalten werden (vgl. Kap. 1.2 und 1.2.6) [18, 145-147]. Um diese zu vermeiden, wurde ein Verfahren entwickelt, welches in der EU speziell für die Testung auf YTXs sowie die Toxine der OA-Gruppe und PTXs angewendet werden soll. Danach werden durch verschiedene weitere Extraktionsschritte die YTXs von den Toxinen der OA-Gruppe und den PTXs getrennt [26]. Allerdings gelangen hierbei auch die ds YTXs in die Fraktion der OA-Gruppe/PTXs und werden über den MBA gemeinsam mit diesen DSP-Toxinen erfasst [125].

Für die Analyse von evtl. mit CTXs belasteten Fischen mittels MBA kann das Probenmaterial nach einem Verfahren von HOFFMANN *et al.* (1985) extrahiert werden. Der Extrakt wird i.p. injiziert, die Mäuse stehen 24 h unter Beobachtung und die für CTXs typischen Symptome werden registriert [148]. Generelle Nachteile des MBA sind aber, dass es durch die

biologische Varianz zwischen den verschiedenen Mäusestämmen, dem unterschiedlichen Gewicht der Tiere innerhalb der Stämme und den abweichenden Reaktionen zwischen den Geschlechtern zu falsch-negativen aber auch zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann.

### 1.3.2 *in vitro*-Verfahren

Neben der Testung an lebenden Organismen kommen für beide Toxine auch *in vitro*-Verfahren zum Einsatz. Hierbei werden außerhalb des lebenden Organismus, z.B. in Zelllinien, die für die Toxine spezifischen Wirkungen beobachtet und mit den Wirkungen eines Standards verglichen.

Für CTXs wird der Maus-Neuroblastom-Zell (N2a)-Assay angewendet. In diesem Zytotoxizitätstest werden die Fischproben auf Substanzen, welche den Na<sub>v</sub>-Kanal aktivieren (CTXs) im Vergleich zu Substanzen, welche den Na<sub>v</sub>-Kanal blockieren, getestet (Tetrodotoxin (TTX), STX) [149].

Auch für die Bestimmung von YTXs werden ähnliche Verfahren angewendet. Bei Einsatz eines von AUNE *et al.* (1991) entwickeltem Zytotoxizitätstest ist es möglich, Unterschiede der Symptomatik zwischen den Durchfall-induzierenden Toxinen (OA, DTX) und den Toxinen die keinen Durchfall hervorrufen (PTX, YTX), zu finden. Nachteile dieses Tests sind ein hoher finanzieller Aufwand und keine eindeutigen Ergebnisse bei Vorhandensein mehrerer Substanzen [150]. Die Akkumulation des ECRA<sub>100</sub>-Fragmentes wird ebenfalls zur YTX-Bestimmung eingesetzt. [151, 152]. Außerdem wurde ein Assay entwickelt, welcher auf dem durch YTX hervorgerufenen Anstieg der PDE-Aktivität und dem daraus resultierenden Absinken der cAMP-Konzentration in der Zelle beruht (vgl. Kap. 1.2.6) [138, 153]. Nachteile bei all diesen Assays sind vor allem die fehlende Differenzierung zwischen den einzelnen Toxin-Analoga und die große Störanfälligkeit aufgrund ebenfalls extrahierbarer Wirksubstanzen aus der Probenmatrix [18].

### 1.3.3 Immunochemische Verfahren

Neben den genannten funktionalen Assays gelangen auch immunochemische Verfahren zur Bestimmung von CTXs und YTXs zum Einsatz. Den Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibt es in vielen Varianten für eine Vielzahl Toxine [154]. Hierbei binden modifizierte

(markierte) Antikörper an das Antigen (Toxin) aus der zu untersuchenden Probe und können als Antigen-Antikörperkomplex nachgewiesen werden. Nachteilig sind die geringe Korrelation zwischen Antikörper-Bindungs-Kapazität und relativer Toxizität [155]. Für die Analyse von CTX und YTX wurden bereits ELISA-Verfahren entwickelt [156, 157].

### **1.3.4 Physikalisch-chemische Verfahren**

#### **1.3.4.1 Flüssigkeitschromatographische Verfahren**

Bei der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) können Substanzen mittels einer mobilen flüssigen Phase, dem Eluenten, über eine feste stationäre Phase, welche eine Säule mit dicht gepacktem Material darstellt, aufgetrennt werden. Im Anschluss an die Trennung werden die nacheinander eluierten Substanzen durch einen geeigneten Detektor registriert. Für die Detektion der chromatographisch getrennten Substanzen eignen sich z.B. UV/VIS- oder Fluoreszenz (FLD)-Detektoren. Zunehmend setzen sich zur Identifizierung von marinen Biotoxinen aber massenspektrometrische Detektionsverfahren durch. Diese sind sehr sensitiv und liefern zusätzliche Informationen hinsichtlich der Struktur der detektierten Substanzen.

Für die beiden zu untersuchenden Toxin-Gruppen unterscheiden sich die HPLC-Bedingungen nur geringfügig. Für die chromatographische Trennung der Analyten werden Reversed Phase (RP)-Säulen eingesetzt. Die Elution erfolgt meist mittels Mischungen aus  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$  oder  $\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ , welche leicht flüchtige oft angesäuerte Puffergemische enthalten.

##### **1.3.4.1.1 Flüssigkeitschromatographie (LC) mit massenspektrometrischer Detektion (MS)**

Der Einsatz von Massenspektrometern (MS) als Detektor nach einer chromatographischen Trennung mittels HPLC gewann mit der Entwicklung von Ionenquellen, die unter Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Ionisation, API) arbeiten können, einen enormen Aufschwung, denn MS-Detektoren zeichnet eine besonders hohe Selektivität aus. Zur Messung der Substanzen ist jedoch eine Ionisierung notwendig. Hierbei können die Moleküle mittels API substanzspezifisch durch die Elektrospray-Ionisierung (ESI), die Chemische Ionisierung (APCI) oder die Photoionisation (APPI) ionisiert werden [158-160].

Für leicht ionisierbare Moleküle, wie die zu untersuchenden Substanzen CTXs und YTXs, werden vorrangig ESI-Verfahren eingesetzt. Durch das Anlegen einer Hochspannung zwischen der Kapillare, die den Eluenten in die Ionenquelle (Interface) führt, und der sog. „Curtain Plate“ entsteht ein elektrisches Feld, dass die ionisierten Moleküle in Richtung der Gegenelektrode beschleunigt. Ein um die Kapillare angeordneter Stickstoffstrom unterstützt die Zerstäubung der Probenmoleküle, und zusätzlich bewirkt ein beheizter Stickstoff ( $N_2$ )-Strom die weitgehende Verdampfung des Lösungsmittels. Dadurch wird die Ladungsdichte im Tropfen erhöht, bis es schließlich zum Überschreiten des Rayleigh-Limits und zur Coulomb-Explosion kommt. Erst danach liegen einzelne Ionen vor, die dann in den Massenanalysator geleitet werden können.

Nach der Ionisierung passieren die Ionen einen weiteren  $N_2$ -Vorhang, welcher zwischen dem Interface und dem unter Hochvakuum stehenden Quadrupol eine Art Schutzgas bildet. Durch das Anlegen zusätzlicher Potentiale (Focussing Potential, FP und Declustering Potential, DP) werden die Ionen durch den „Orifice“, das Fadenkreuz und den geerdeten „Skimmer“ in den Massenanalysator (Quadrupol) beschleunigt. Dieser besteht aus vier mit unterschiedlichem Spannungspotential belegten parabolisch angeordneten Stabelektroden. Die Moleküle werden hier nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) separiert. Dies geschieht sowohl in „single“ Quadrupol Massenspektrometer, bei welchen nur ein Quadrupol die Ionen nach dem  $m/z$ -Verhältnis separiert, als auch in „tripel“ Quadrupol bzw. Tandem-Massenspektrometern (MS/MS). Letztere bieten weitere Analysenmöglichkeiten, welche im Folgenden beschrieben werden sollen.

Prinzipiell bestehen MS/MS-Apparaturen auf der Basis von Quadrupolen aus den Quadrupolen  $Q_1$ ,  $q_2$  und  $Q_3$ .  $Q_1$  und  $Q_3$  sind Massenspektrometer,  $q_2$  eine Kollisionszelle. Zur Selektierung der Ionen im  $Q_1$  und  $Q_3$  nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis liegt an den Stabelektroden eine Gleichspannung (DC) an, welche mit einer hochfrequenten Wechselspannung (RF) überlagert ist. Erst das Zusammenspiel beider Spannungen ermöglicht die Selektion der Ionen bei einer stabilen Flugbahn durch die Quadrupole. Schließlich gelangen die Ionen in den Detektor des Massenspektrometers, meist ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV), und sie werden als elektrisches Signal registriert.

Im Gegensatz zum einfachen MS können im MS/MS nach der Selektion im  $Q_1$  die Ionen in  $q_2$  durch Kollision mit einem inerten Gas fragmentiert werden. Anschließend können sie im  $Q_3$  nach dem  $m/z$ -Verhältnis der Fragmente nochmals separiert werden [158].  $Q_1$  und  $Q_3$

können jeweils separat voneinander entweder im „Scan“-Modus oder im „Single Ion Monitoring“ (SIM)-Modus zur Messung herangezogen werden. Im Ersteren wird ein bestimmter Massenbereich (z.B. 800-1400 amu) „gescant“ und alle Ionen, deren  $m/z$ -Verhältnis in diesem Bereich liegt, werden detektiert. Im Gegensatz dazu werden im SIM-Modus lediglich bestimmte  $m/z$ -Verhältnisse selektiv gemessen. Durch Kombination dieser beiden Verfahren ergeben sich mehrere Mess-Modi: der Product-Ion (PI)-, der Precursor-Ion (PC)-, der Neutral-Loss (NL)- und der Multi-Reaction-Monitoring (MRM)-Modus.

Beim PI-Modus werden im Q1 die Ionen selektiv nach einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis aufgetrennt. In der Kollisionszelle werden sie fragmentiert, um die entstandenen Ionen dann durch einen Scan im Q3 bestimmen zu können. Im PC-Modus arbeitet Q1 im Scan-Modus. Deshalb werden hierbei zunächst alle Ionen, die in einem gewissen Massen-Bereich liegen, in die Kollisionszelle geleitet, wo sie fragmentiert werden können. Erst im Q3 erfolgt die Messung der vorher festgelegten  $m/z$ -Verhältnisse. Somit können im PC-Modus Substanzen detektiert werden, die ein definiertes Fragment bilden. Hingegen erfolgt im NL-Modus die Erfassung aller Substanzen, welche durch Fragmentierung im Q2 ein Neutralteilchen verlieren. Dazu arbeiten die beiden Massenspektrometer synchron im Scan-Modus und im Q3 wird die entsprechende Masse um die jeweilige Neutralteilchen-Masse vermindert erfasst. Im MRM-Modus werden in Q1 und Q3 die  $m/z$ -Verhältnisse selektiv gemessen. Nach der Kollision können im Q3 ein oder mehrere Fragmente mit Zugehörigkeit zu einer zuvor im Q1 determinierten Masse bestimmt werden. Somit kann eine sichere, selektive Bestimmung von Substanzen erfolgen, deren Fragmente bekannt sind [158-160].

#### 1.3.4.1.2 Fluorimetrische Detektionsverfahren

Neben dem Einsatz von massenspektrometrischen Verfahren können einige YTXs auch mittels HPLC-FLD-Methoden analysiert werden. Mittels einer von YASUMOTO und TAKIZAWA etablierten HPLC-FLD-Methode können YTX, homo YTX und die 45-OH Metabolite detektiert werden. Hierbei wurde das fluoreszenzaktive Dienophil DMEQ-TAD (4-[2-(6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaliny)ethyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione) verwendet, um an die konjugierte Dien-Struktur in der Seitenkette einiger YTXs zu binden und diese somit fluoreszenzaktiv zu machen (vgl. Abb. 8) [161, 162]. Es ist jedoch nicht möglich YTX-Analoga zu erfassen, die keine konjugierte Dien-Struktur in der Seitenkette aufweisen. Außerdem



entstehen zwei Diastereomere, welche zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluieren. Somit ist eine Identifizierung der YTX-Analoga ohne Einsatz entsprechender Standardsubstanzen nicht möglich. Außerdem eluieren z.B. YTX und homo YTX zur gleichen Zeit, so dass diese ebenfalls nicht getrennt analysiert werden können [162].

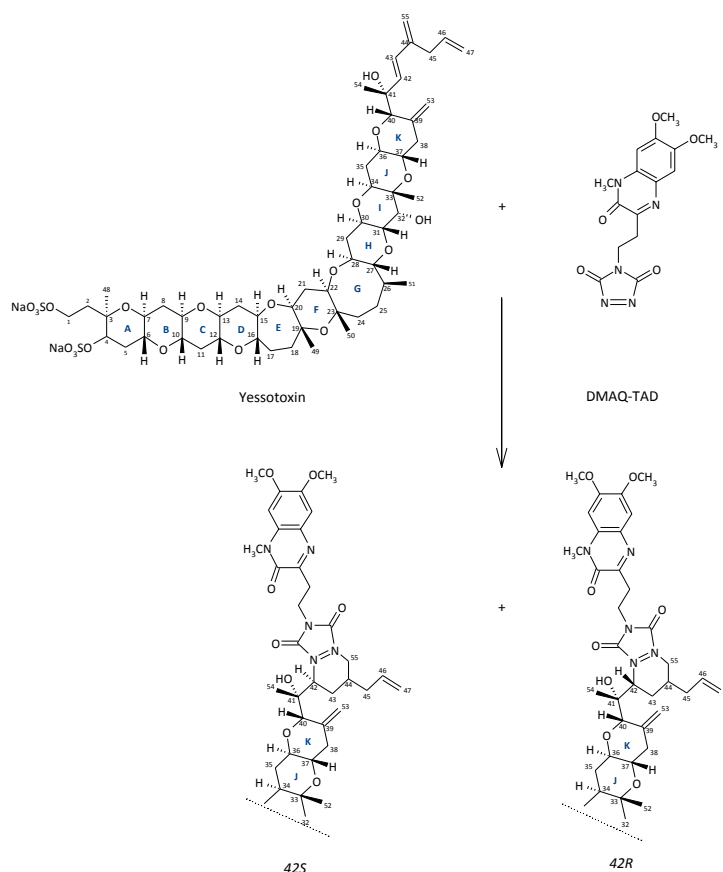


Abb. 8: Derivatisierungs-Reaktion von YTX durch DMEQ-TAD

#### 1.3.4.1.1 UV/VIS Detektionsverfahren

Da einige YTXs ein Absorptionsmaximum bei Wellenlängen im ultravioletten (UV)/visuellen (VIS) Bereich haben, können sie mittels UV/VIS-Methoden detektiert werden (vgl. Tab. 5).

#### 1.3.4.2 Kapillarelektrophorese

Die Detektion mariner Biotoxine nach ihrer Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese als Alternative zur chromatographischen Trennung ist ebenfalls beschrieben worden. In diesem Fall basiert die Trennung auf der unterschiedlichen Wanderung der Toxine im elektrischen Feld. Für den Nachweis von YTX sowie MTX existieren Methoden für ihre Separation mittels Kapillarelektrophorese [163, 164].

## 1.4 Lebensmittelrechtliche Relevanz

### 1.4.1 Toxizität von CTXs und YTXs

Im MBA erwies sich CTX mit einer  $LD_{50}$  von 0,45  $\mu\text{g/kg KG}$  (i.p.) als extrem toxisch. Wahrscheinlich kann bereits die Aufnahme einer Dosis von 0,1  $\mu\text{g}$  CTX die typischen Symptome hervorrufen [94, 96]. Mit einer  $LD_{50}$  von 0,2  $\mu\text{g/kg KG}$  (i.p.) ist MTX etwa doppelt so toxisch wie CTX und sogar fünffach toxischer als TTX [94].

Für YTX i.p. injiziert wurde eine  $LD_{50}$  zwischen 80 bis 750  $\mu\text{g/kg KG}$  ermittelt, wobei z.T. kardiotoxische Wirkungen erkennbar waren. Bei oraler Gabe wurde als maximale nicht letale Dosis von OGINO *et al.* (1997) 1,0 mg YTX/kg KG ermittelt [135]. Andere Autoren berichten von maximal nicht letalen Dosen von bis zu 10 mg/kg KG, jedoch traten bei diesen Mengen teilweise Veränderungen des Gewebes im Herzen auf [22, 165].

Allerdings konnten diese Wirkungen für andere YTX-Analoga nur teilweise bestätigt werden, denn einige YTX-Strukturvarianten stellen nur ein geringes Risiko für die menschliche Gesundheit dar [27, 118, 131, 135, 166]. Hingegen ist YTX hinsichtlich seiner Wirksamkeit in etwa vergleichbar mit homo YTX, während die OH- und COOH-Derivate wahrscheinlich weniger wirksam sind [45]. Auch MILES *et al.* (2004 und 2004) konnten bei zwei Analoga zeigen, dass die Toxizität mit dem Fehlen der Seitenkette des heptanor-41oxo YTX 1,3 enone sowie durch Vorhandensein der polareren Seitenkette des trihydroxilierten Amides des 9-Me-41a-homo YTX sinkt [121, 167]. Nach DOMÍNGUEZ *et al.* (2010) besitzt auch ATX B, bei dem ebenfalls die Seitenkette fehlt, eine viel geringere Induktion der PDE-Aktivität als YTX. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bioaktivität von YTX stark mit dem Vorhandensein des terminalen Restes zusammenhängt (vgl. Kap. 1.2.6) [128, 129].

2009 wurden durch die EFSA Toxizitätsequivalenzfaktoren (TEFs) für vier YTXs vorgeschlagen. So soll für YTX, 1a-homo YTX und 45-OH YTX der Faktor 1 gelten, und für 45-OH-1a-homo YTX soll 0,5 als TEF eingeführt werden [28].

### 1.4.2 Gesetzliche Regelungen

Um eine Gesundheitsgefährdung der Verbraucher durch mit marinen Biotoxinen kontaminierte Lebensmittel auszuschließen wurden von der EU Gesetze erlassen, in denen die maximal zulässigen Gehalte an marinen Biotoxinen in Fischen und Meeresfrüchten

geregelt werden. Gemäß Verordnung der EU (EG) Nr. 853/2004 Anhang II Abschnitt VIII Kap. V.E.I., dürfen: „Fischereierzeugnisse, die Biotoxine wie Ciguatoxin oder Muskellähmungen bewirkende Toxine enthalten, (...) nicht in Verkehr gebracht werden“ [168]. Auch waren bereits mit der Entscheidung der EU (EG) Nr. 225/2002 die auch heute noch geltenden Höchstmengen eingeführt, und diese sind durch die nachfolgenden Verordnungen, (EG) Nr. 853/2004 und (EG) Nr. 854/2004 bestätigt worden. Für die YTXs wurde jedoch der bis dahin geltende Grenzwert auf 1 mg/kg YTX-Äquivalenten erhöht [26]. Dieser Beschluss führte zu einer Abnahme der durch Höchstmengenüberschreitungen verursachten Schließungen von Muschelfarmen [22, 117]. Die EU-Verordnung (EG) Nr. 854/2004 enthält außerdem „(...) besondere(...) Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs“ [169]. Diese gesetzlichen Regelungen gelten in der EU für YTX, 45-OH YTX, homo YTX und 45-OH homo YTX [168]. Im vergangenen Jahr veröffentlichte die EFSA jedoch einen Artikel, in dem eine Neu-Regelung der Grenzwerte für marine Biotoxine vorgeschlagen wird (vgl. Tab. 6) [28].

Tab. 6: Übersicht über die von der "FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs" vorgeschlagenen sowie in der EU geltenden Toxin-Grenzwerte [20, 28, 168]

Toxin-Gruppe	Richtwert/ Max Level	Richtwert/ Max Level	Aktueller Grenzwert in der EU [168, 170]*
	FAO/IOC/WHO 2004 [20]*	FAO/IOC/WHO 2009 [28]*	
<b>AZA</b>	160 µg AZA eq./kg	30 µg AZA eq./kg	160 µg AZA eq./kg
<b>DA</b>	20 mg DA/kg	4,5 mg DA/kg	20 mg DA/kg
<b>OA-Gruppe</b>	160 µg OA eq./kg	45 µg OA eq./kg	160 µg OAeq./kg
<b>PTX</b>	(OA, DTX, PTX)	120 µg PTX2 eq./kg	(OA, DTX, PTX)
<b>STX</b>	800 µg PSP/kg	75 µg PSP/kg	800 µg PSP/kg
<b>YTX</b>	1 mg YTX eq./kg	4,5 mg YTX eq./kg	1 mg YTX eq./kg
<b>CTX</b>			darf nicht vorkommen

\*Angaben pro kg Muschelfleisch

Allerdings wurden auch in der neuesten Verordnung der EU (EG) Nr. 2074/2005 die in der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 sowie (EG) Nr. 225/2002 festgelegten Analysen-Methoden und Höchstwerte bestätigt. Der Maus Bioassay bleibt demnach die Standardmethode für den Nachweis lipophiler Toxine. Es können zwar alternativ und/oder zusätzlich andere Nachweisverfahren, wie HPLC-FLD, LC-MS, LC-MS/MS, Immunoassays oder funktionale Assays eingesetzt werden [170], jedoch bleibt durch das Festhalten am MBA die Problematik bzgl. der falschen Ergebnisse bestehen (vgl. 1.3).

## 1.5 Fragestellungen/Zielsetzungen

Die Untersuchung mariner Organismen hinsichtlich einer Kontamination mit Biotoxinen stellt eine wichtige Aufgabe für die Lebensmittelüberwachung dar. Vor allem der steigende Verzehr von Fisch und anderen Meeresfrüchten sowie eine verstärkte Befischung der Meere machen eine Ausweitung der Kontrollen notwendig. Den Polyethertoxinen CTXs und YTXs wird dabei besondere Beachtung geschenkt. Während das Problem Ciguatera durch den steigenden Tourismus in tropische Länder inzwischen auch in der Öffentlichkeit diskutiert wird, sind es bei den YTXs vor allem die noch fehlenden Erkenntnisse über die Toxizität der bei der Metabolisierung von YTX entstehenden Analoga, die zu Forschungen Anlaß geben. Für den Nachweis von CTXs in Fischen gibt es zahlreiche Methoden, mit denen eine Kontaminierung nachgewiesen werden kann (vgl. Kap. 1.3). In Deutschland sind bisher jedoch nur wenige Labore in der Lage, die CTXs mittels LC-MS/MS-Verfahren eindeutig zu detektieren. Außerdem bereitet die Identifizierung der Vorläufertoxine in den CTX-produzierenden Mikroalgen mittels massenspektrometrischer Detektion immer noch Schwierigkeiten.

1. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, welche die LC-MS/MS-Analyse von Algen und Fischen im Hinblick auf die Bildung bzw. Akkumulation von CTXs ermöglicht.
2. Diese Methode sollte zur Bestimmung der CTX-Vorläufertoxine bei Spezies der Gattung *Gambierdiscus* mit unterschiedlicher Herkunft zum Einsatz kommen, um die jeweilig produzierten CTXs zu identifizieren und die verschiedenen Stämme hinsichtlich ihrer CTX-Profile vergleichen zu können.
3. Außerdem sollten ökologische Einflüsse auf die CTX-Produktion von *Gambierdiscus* spp. untersucht werden.

Mit dem Einhergehen von Eutrophikation und Klimawandel stellt sich die Frage, ob bestimmte Umweltbedingungen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von HAB's steigern können. Deshalb wird in der Deutschen Bucht, die bisher kein typisches Gebiet für das Auftreten hoher Konzentrationen an marinen Biotoxinen war, intensiv verfolgt, ob und wie sich die Phytoplankton-Gemeinschaften verändern.

4. Um Risikoabschätzungen für das vermehrte Auftreten des in der Deutschen Bucht endemisch auftretenden Dinoflagellaten *Protoceratium reticulatum* durchführen zu können, sollte dieser unter bestimmten autökologischen Bedingungen kultiviert werden.
5. Außerdem sollten Informationen gewonnen werden, unter welchen Bedingungen die Bildung von YTXs durch *P. reticulatum* ein Maximum erreicht.
6. Kontrovers wird diskutiert, ob YTXs aktiv aus der Zelle heraus transportiert und in das umgebende Medium abgegeben werden. Deshalb sollten auch die extrazellulären Konzentrationen an YTXs bestimmt werden.
7. Da selbst Dinoflagellaten der gleichen Spezies oftmals sehr variabel auf Umwelteinflüsse reagieren, sollten neben dem heimischen *P. reticulatum*-Stamm weitere potentielle YTX-Produzenten untersucht werden.
8. Bei der Vielzahl der YTX-Analoga, welche aus Muscheln und Dinoflagellaten extrahiert wurden, stellte sich die Frage, welche Analoga bereits vom Phytoplankton produziert werden. Deshalb sollten *P. reticulatum*-Kulturen verschiedener Herkunft bzgl. ihrer YTX-Profile untersucht werden.

Im Organismus unterliegt YTX bestimmten Entgiftungsmechanismen. Dabei spielen Oxidation, Carboxylierung und andere Umlagerungen eine Rolle.

9. Mit der Metabolisierung speziell von YTX durch Schalentiere gehen auch Änderungen der Toxizität einher. Deshalb sollten für die Fischereiwirtschaft wichtige Schalentier-Spezies hinsichtlich ihrer Entgiftungskapazität untersucht werden.
10. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf die Entstehung bisher weitgehend unbekannter YTXs gelegt werden, denn die EU-Verordnung (EG) Nr. 853/2004 regelt bisher nur die maximal zulässigen Konzentrationen an YTX, homo YTX, OH YTX und OH-homo YTX, obwohl wenig über die Toxizität anderer YTX-Analoga bekannt ist.

## 2 Übersicht zu den Manuskripten

Manuskript I

### **Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp.**

Roeder, K., Erler, K., Kibler, S., Tester, P., Van The, H., Nguyen-Ngoc, L., Gerdt, G., Lucas, B.

*Toxicon*, Datum der Annahme: 31 Juli 2009, doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.039

Die Detektion der CTXs aus *Gambierdiscus* spp. bereitet bis heute Schwierigkeiten. Deshalb sollte eine LC-MS/MS-Methode entwickelt werden, die die Detektion der Vorläufertoxine ermöglicht. Mittels dieser Methode wurden *Gambierdiscus* spp.-Stämme mit unterschiedlicher Herkunft auf ihr Toxinprofil untersucht und es konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in den produzierten Substanzen gibt. Weiterhin ergab sich, dass die Salinität des Kulturmediums einen Einfluss auf das Toxinprofil eines Stammes aus Vietnam hat.

#### **Arbeitsanteile gemäß Autorenvereinbarung:**

Karin Roeder:

Kultivierung von *Gambierdiscus* spp., Applikation der LC-MS/MS-Analysenmethode, Probenaufarbeitung, Auswertung der Daten, Erstellung des Manuskriptes

Katrin Erler:

Applikation der LC-MS/MS-Analysemethode

Dr. Steven Kibler und Prof. Patricia Tester:

Bereitstellung der *Gambierdiscus* spp.-Kulturen der National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)

Ho van The und Prof. Lam Nguyen-Ngoc:

Bereitstellung eines Strains *G. toxicus* zur Kultivierung, Kultivierung dieses Strains in verschiedenen Medien, Morphologische Bestimmung der Kultur

Dr. Gunnar Gerdt:

Kultivierung von *Gambierdiscus* spp., Korrektur des Manuskriptes

Prof. Bernd Lucas:

Korrektur des Manuskriptes

Manuskript II

**Effects of salinity, temperature and nutrients on the yessotoxin  
production of *Protoceratium reticulatum* in connection with the cell  
cycle, cell size and chlorophyll *a* concentration**

Röder, K., Gerdt, G., Hantzsch, F.M., Gebühr, C., Helbig, T., Krock, B., Hoppenrath, M.,  
Luckas, B.

*European Journal of Phycology*, Eingereicht am: 05. März 2010

Die Eutrophikation und der Klimawandel stehen in der Diskussion die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von HAB's zu beeinflussen. Deshalb ist es notwendig zu untersuchen, ob es mit Veränderung von Temperatur und Nährstoffverfügbarkeit in der Nordsee zu einem erhöhten Risiko für HAB's endemischer Arten kommt. Wir konnten zeigen, dass eine Temperaturerhöhung der Nordsee nicht zu einem erhöhten Risiko für eine Blüte des *P. reticulatum*-Stammes führt, jedoch kommt es durch Phosphat (P)-Limitierung unter bestimmten Bedingungen zu einem erhöhten Toxingehalt pro Zelle. Die Analyse weiterer Parameter wie der Morphologie, der Größe und der Chlorophyll a-Konzentration der Zellen konnten außerdem Hinweise für die Ursache der gesteigerten Toxinproduktion unter P-Limitierung in *P. reticulatum* liefern.

**Arbeitsanteile gemäß Autorenvereinbarung:**

Karin Röder:

Kultivierung von *P. reticulatum*, Versuchsdurchführung, Applikation der LC-MS/MS  
Analysenmethode, Probenaufarbeitung, Auswertung der Daten, Erstellung des  
Manuskriptes

Florian Hantzsch,:

Einführung Flow Cam, Korrektur des Manuskriptes

Christina Gebühr:

Korrektur des Manuskriptes

Tina Helbig:

Versuchsdurchführung

Dr. Mona Hoppenrath:

Isolierung, Identifikation *P. reticulatum*, Korrektur des Manuskriptes

Prof. Bernd Luckas, Dr. Gunnar Gerdt, Dr. Bernd Krock:

Korrektur des Manuskriptes

Manuskript III

## **Influence of phosphorus concentration on the yessotoxin formation of different strains of *Protoceratium reticulatum***

Röder, K., Gerds, G., Koike, K., Cembella, A., Krock, B., Luckas, B.

geplanter Ort der Veröffentlichung: *European Journal of Phycology*

Da P-Limitierung des Mediums in dem *P. reticulatum*-Stamm aus der Nordsee scheinbar zu einem erhöhtem Toxingehalt pro Zelle führt und dieses Ergebnis nicht mit bestehenden Publikationen anderer Autoren übereinstimmt, sollten weitere Stämme dieser Spezies unter P-Limitierung kultiviert werden. Die Ergebnisse dieser Studie bekräftigten die Theorie, dass die Toxinakkumulation in *P. reticulatum* mit einem fortschreitenden Metabolismus der Zellen zum Ende der stationären Phase korreliert.

### **Arbeitsanteile gemäß Autorenvereinbarung:**

Karin Röder:

Kultivierung von *P. reticulatum*, Versuchsdurchführung, Modifikation der LC-MS/MS-Analysenmethode, Probenaufarbeitung, Auswertung der Daten, Erstellung des Manuskriptes

Dr. Bernd Krock:

Applikation der LC-MS/MS-Analysenmethode, Korrektur des Manuskripts

Prof. Bernd Luckas, Dr. Gunnar Gerds, Prof. Allan Cembella:

Korrektur des Manuskripts

Prof. Kazuhiko Koike:

Bereitstellung des *P. reticulatum*-Stammes aus Japan



Manuskript IV

## **Complex yessotoxins profile in different strains of *Protocerratium reticulatum***

Röder, K., Gerds, G., Koike, K., Cembella, A., Krock, B., B. Luckas

geplanter Ort der Veröffentlichung: *Toxicon*

Das Toxinprofil in Stämmen der Spezies *Protocerratium* variiert in Abhängigkeit vom Ursprung der Isolate. Diese Publikation beschreibt die Identifizierung einer Vielzahl charakteristischer YTXs in Kulturoisolate aus Japan, Australien, Neuseeland, den USA, Norwegen und Deutschland. In einigen dieser Isolate konnten YTXs bestimmt werden, welche in vorangegangenen Studien nicht identifiziert werden konnten. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Analoga z.T. einen größeren Anteil als YTX ausmachen können.

### **Arbeitsanteile gemäß Autorenvereinbarung:**

Karin Röder:

Kultivierung von *P. reticulatum*, Versuchsdurchführung, Modifikation der LC-MS/MS-Analysenmethode, Probenaufarbeitung, Auswertung der Daten, Erstellung des Manuskriptes

Dr. Bernd Krock:

Applikation der LC-MS/MS-Analysenmethode, Korrektur des Manuskripts

Prof. Bernd Luckas, Dr. Gunnar Gerds, Prof. Allan Cembella:

Korrektur des Manuskripts

Prof. Kazuhiko Koike:

Bereitstellung der *P. reticulatum*-Stämme aus Japan

Manuskript V

**Accumulation and metabolism of yessotoxin produced by  
*Protoceratium reticulatum* in Blue mussel (*Mytilus edulis*) and  
Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)**

Röder, K., Fritz, N., Gerds, G., Luckas, B.

*Harmful Algae*, Eingereicht am: 30. November 2010

Diese Publikation beschreibt die Akkumulation und den Metabolismus von YTX in zwei für die deutsche Fischereiwirtschaft wichtigen Schalentierspezies. Der bisher bekannte Metabolismus in *M. edulis* konnte bestätigt und ergänzt werden. Außerdem wurde bewiesen, dass der Metabolismus in *C. gigas* sich von dem in *M. edulis* unterscheidet und in dieser Spezies ein YTX-Analogon, wahrscheinlich eines der keto YTXs, über einen gewissen Zeitraum akkumuliert wird. Dies ist von besonderem Interesse, da diese Spezies bisher nicht dafür bekannt war, YTXs über einen längeren Zeitraum zu akkumulieren.

**Arbeitsanteile gemäß Autorenvereinbarung:**

Karin Röder:

Kultivierung von *P. reticulatum*, Versuchsdurchführung, Modifikation der Analysenmethode, Probenaufarbeitung, Auswertung der Daten, Erstellung des Manuskriptes

Nicole Fritz:

Versuchsdurchführung

Prof. Bernd Luckas, Dr. Gunnar Gerds:

Korrektur des Manuskripts

### 3 Manuskript I

## Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp.

### Autoren:

Karin Roeder <sup>1</sup>, Katrin Erler <sup>1</sup>, Steven Kibler <sup>3</sup>, Patricia Tester <sup>3</sup>, Ho Van The <sup>4</sup>, Lam Nguyen-Ngoc <sup>4</sup>, Gunnar Gerdt <sup>2</sup>, Bernd Luckas <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, LS Lebensmittelchemie, Dornburger Straße 25, 07743 Jena, Deutschland

<sup>2</sup> Biologische Anstalt Helgoland, Alfred-Wegener-Institute für Polar- und Meeresforschung, POB 180, 27498 Helgoland, Deutschland

<sup>3</sup> National Ocean and Atmospheric Administration, National Ocean Service, Beaufort, USA

<sup>4</sup> Institute of Oceanography, Cauda 01, Vinh Nguyen, Nha Trang, Vietnam

### Korrespondierender Autor:

Karin Roeder

Department of Food Chemistry, Faculty of Biology and Pharmacy, University of Jena,  
Dornburger Str. 25, 07743 Jena, Germany

Tel.: +49 3641 949 653, Fax.: +49 3641 949 652

E-mail address: [Karin.Roeder@uni-jena.de](mailto:Karin.Roeder@uni-jena.de)

## ARTICLE IN PRESS

Toxicon xxx (2009) 1–8



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp.

Karin Roeder<sup>a,\*</sup>, Katrin Erler<sup>a</sup>, Steven Kibler<sup>c</sup>, Patricia Tester<sup>c</sup>, Ho Van The<sup>d</sup>,  
Lam Nguyen-Ngoc<sup>d</sup>, Gunnar Gerdt<sup>b</sup>, Bernd Luckas<sup>a</sup>

<sup>a</sup> University of Jena, Faculty of Biology and Pharmacy, Department Food Chemistry, Dornburger Str. 25, 07743 Jena, Germany

<sup>b</sup> Biologische Anstalt Helgoland, Alfred Wegener Institute, Helgoland, Germany

<sup>c</sup> National Ocean and Atmospheric Administration, National Ocean Service, Beaufort, USA

<sup>d</sup> Institute of Oceanography, Cauda 01, Vinh Nguyen, Nha Trang, Viet Nam

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 January 2009

Received in revised form 27 July 2009

Accepted 30 July 2009

Available online xxxx

## Keywords:

Marine biotoxins

Ciguatera fish poisoning

*Gambierdiscus* spp.

## ABSTRACT

Ciguatera fish poisoning characterizes the intoxication caused by consumption of fish from tropical and subtropical areas, which have accumulated ciguatoxins (CTXs). The observed pattern of ciguatoxins in fish highly depends on the marine region and the causative organisms. It is evident that differences exist between ciguatoxins produced by certain strains of the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* and other *Gambierdiscus* spp. In this context cultured strains purchased from the Provasoli–Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) and strains from Vietnam were analyzed. Besides, lyophilized samples of several *Gambierdiscus* spp. from the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), USA and lyophilized samples of *G. toxicus* from Vietnam were analyzed. The latter has been cultured at different salinities.

We observed differences between the toxin ratios of the analogues in the strain from Vietnam depending on the salinity. The CTX profiles of the Vietnamese samples were compared with cultures of *Gambierdiscus* spp. from CCMP and the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) resulting in an overview of toxins in cultures from different regions. Hence, it was obvious that the strain from Vietnam forms a characteristic CTX profile which is not directly comparable to CTX pattern observed in other tropical marine regions.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The term Ciguatera Fish Poisoning (CFP) is commonly used to describe the intoxication caused by consumption of fish, primarily reef fish from tropical and subtropical areas, which have accumulated ciguatoxins (CTXs). The CFP occurs mainly between 35° Northern and 35° Southern latitude. Producers of CTXs are epiphytic living dinoflagellates from the class Gonyaulacales; more precisely

belonging to the genus *Gambierdiscus* (Bagnis et al., 1980). Especially *Gambierdiscus toxicus* (Adachi and Fukuyo, 1979) is a known producer of precursor CTXs (Scheuer et al., 1967; Murata et al., 1989), maitotoxin (MTX) (Yasumoto et al., 1977; Murata et al., 1993), gambierol (Satake et al., 1993; Morohashi et al., 1998) and several gambieric acids (Nagai et al., 1992; Morohashi et al., 2000). Related species are *Gambierdiscus yasumotoi* (Holmes, 1998), *Gambierdiscus belizeanus* (Faust, 1995), *Gambierdiscus pacificus*, *Gambierdiscus polynesiensis* and *Gambierdiscus australes* (Chinain et al., 1999). The production of the less oxidised CTXs also referred as gambiertoxins (GTXs), by *G. toxicus* is well known (Babinchak et al., 1986; Lewis, 2001; Lehané and Lewis, 2000). It is established that this species can produce

\* Corresponding author. Tel.: +49 3641 949 653; fax: +49 3641 949 652.  
E-mail address: [karin.roeder@uni-jena.de](mailto:karin.roeder@uni-jena.de) (K. Roeder).

## ARTICLE IN PRESS

2

K. Roeder et al. / Toxicon xxx (2009) 1–8

**Table 1**

Toxins detected in the several strains; MW = molecular weight, only major components shown.

Strain denotation/MW	Detected toxins			
	P-CTX-3C 1044.5	2,3-dihydroxy P-CTX-3C 1056.5	51-hydroxy P-CTX-3C 1038.5	P-CTX-4A/B 1060.5
<i>G. toxicus</i> Vietnam	+	+	–	(+)
NOAA 1	–	+	–	–
NOAA 7	–	+	–	–
NOAA 5	–	+	–	–
NOAA 9	–	+	–	–
NOAA 3	–	+	–	–
NOAA 12	–	+	–	–
NOAA 20	–	+	–	–
CCMP 401	–	+	–	–
CCMP 1733	–	+	–	–
CCMP 1653	–	+	–	–

P-CTX-3C, P-CTX-4A and putatively P-CTX-4B (Lewis, 2001; Lehané and Lewis, 2000; Babinchak et al., 1986). The production of GTXs by *Gambierdiscus* spp. varies in different strains (Holmes et al., 1991; Durant-Clement, 1986). Apparently, the toxin production seems to be genetically determined and is stable in cultures (Richlen et al., 2008, and the references therein). In contrast, it is also reported that the CTXs production can decrease during the cultivation of *Gambierdiscus* spp. (Babinchak et al., 1986; Scheuer, 1994).

The unicellular dinoflagellates are attached to macroalgae (Steidinger and Tangen, 1996) and are grazed by small herbivorous fish species which in turn can be eaten by carnivorous fishes like barracuda (*Sphyrna barracuda*) (Kelly et al., 1990; Cruz-Rivera and Villareal, 2006). Without showing abnormal behaviour those larger species can accumulate huge amounts of the metabolized GTXs (Lewis and Holmes, 1993; Lewis, 2001). After ingestion of a toxic fish humans can develop manifold symptoms. The CTXs activates voltage gated sodium channels resulting in a sodium influx into the cell (Dechraoui et al., 1999; Nicholson and Lewis, 2006). This causes digestive symptoms like abdominal pain, vomiting and diarrhea, neurological irregularities such as pruritus (itchy skin), dysesthesia (reversal of hot and cold sensations), numbness and tingling in the extremities, also cardiovascular signs as irregular pulse, decreased blood pressure, bradycardia and persistent general weakness, joint and muscle pain, headaches, dizziness, tremors (Peam, 2001; Lewis et al., 2000; Lehané and Lewis, 2000). First symptoms can appear 30 min after consumption and at least they can last up to several months (Lewis 2001, 2006; Lehané and Lewis, 2000). Heat stable CTXs were detected in tropical waters around the Equator. Ciguatera fish poisoning occurs in the Pacific, for example French Polynesia, New Caledonia, Australia; in the Indian Ocean, in the Caribbean, and in Florida (Laurent et al., 2005). It is established that differences exist between the toxin profiles from fish collected at different sites of the world. Consequently, CTXs are divided in toxins from the Pacific (P-CTXs), the Caribbean (C-CTXs) and the Indian Ocean (I-CTXs) (Lewis et al., 1998).

CTXs are cyclic polyethers showing similar structures as some Diarrhetic Shellfish Poisoning toxins and brevetoxins. Because of the many CTXs analogues and their similar molecular weight a fast and unambiguous determination is difficult. This is of great importance concerning the Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and the Council. There, it was formulated: "Checks have to be done to ensure that fishery products containing biotoxins such as Ciguatera must not be placed on the market". Consequently, intensive research is ongoing to develop LC-MS/MS based methods for the determination of CTXs. Especially for the precursor CTXs produced by dinoflagellates only few information are available concerning toxin profiles and toxin production at different environmental conditions (Holmes et al., 1991; Durant-Clement, 1986).

In this study different *Gambierdiscus* spp. strains purchased from the Provasoli–Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) and strains from Vietnam were analyzed. Besides, lyophilized samples of several *Gambierdiscus* spp. from the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), USA and lyophilized biomass of *G. toxicus* from Vietnam were analyzed to enhance the knowledge about toxin production in several strains of *Gambierdiscus* spp.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Acetonitrile was obtained from Fisher Scientific (Leicestershire, UK), methanol and ammonium formate from VWR International (Belgium). Water for LC-MS/MS analysis was purified using a Millipore-Q (Milford, USA).

### 2.2. Identification of *G. toxicus* from Vietnam

*G. toxicus* was isolated from *Avrainvillea* sp. (Chlorophytes) around Cau Island (108°49' E, 11°13' N), Binh Thuan Province, south central coast of Vietnam.

**Sample preparations for Light Microscope.** The cultured cells were observed alive or fixed with formaldehyde, 0.4% concentration. LM observations were made with Leica

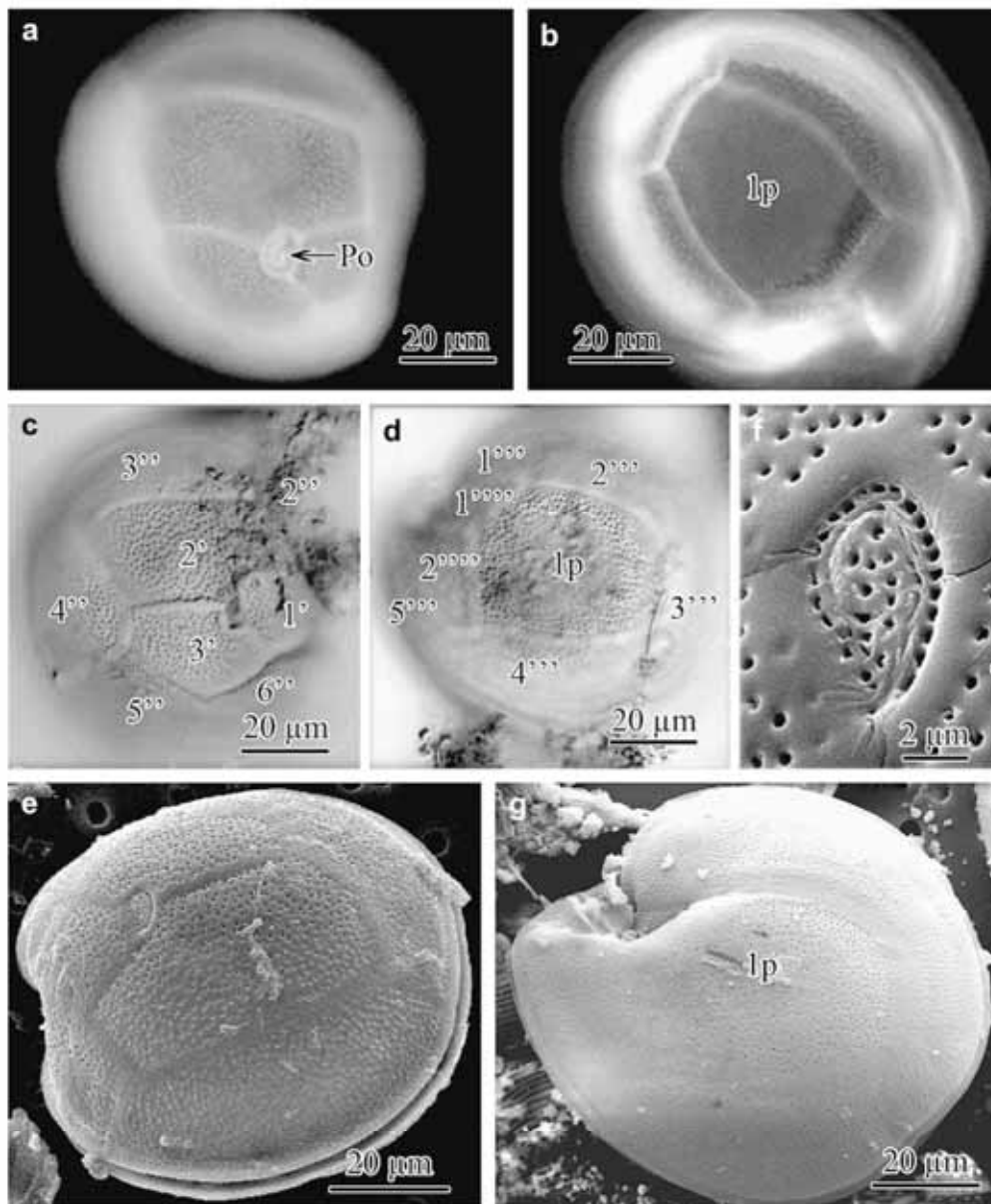
Please cite this article in press as: Roeder, K., et al., Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp., Toxicon (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.039



## ARTICLE IN PRESS

K. Roeder et al. / *Toxicon* xxx (2009) 1–8

3



**Fig. 1.** Thecal morphology of *Gambierdiscus toxicus*. a) Cell in apical view with Po (arrow); b) cell in antapical view with 1p plate; c–e and g) cells showing the plate patterns of antapical view under light microscope and scanning electron microscope; f) details of Po (figures a and b, LM epifluorescence; figures c and d, LM, DIC; figures e–g), SEM).

DMLB light microscope (Germany) with phase contrast and epifluorescence. Photographs were taken with OLYMPUS DP71 (Japan).

**Sample preparations for Scanning Electron Microscope.** Two milliliters of growing cultures were fixed with formaldehyde, 0.4% concentration. They were rinsed 3 times with distilled water and dehydrated in a series of 30, 50, 70, 90, 96 and 100% ethanol. They were coated with gold and observed using a Maxim/Cam Optics Scanning Electron Microscope at Institute of Physics and Astronomy, Aarhus University, Denmark and JEOL JSM-5410 LV Scanning

Electron Microscope at Institute of 69, Hanoi (Vietnam). Species was identified by using the references of Adachi and Fukuyo (1979), Chinain et al. (1999), Larsen and Nguyen (2004).

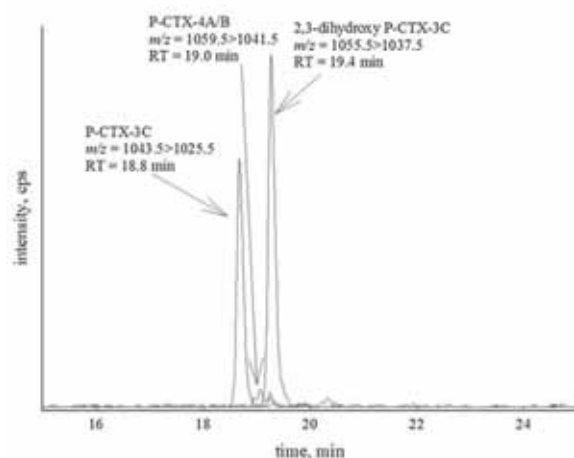
### 2.3. Experimental setup and sample extractions

In this study several strains of the genus *Gambierdiscus* were analyzed. Therefore, different species purchased from the Provasoli–Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) and furthermore one strain

Please cite this article in press as: Roeder, K., et al., Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp., *Toxicon* (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.039

## ARTICLE IN PRESS

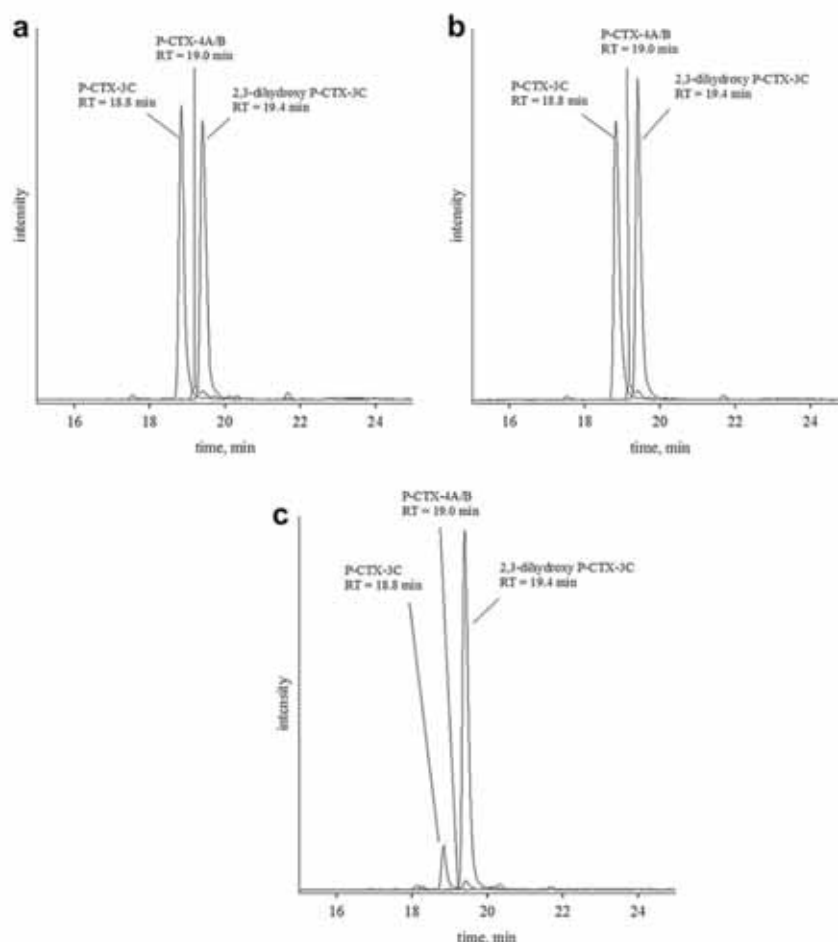
4

K. Roeder et al. / *Toxicon* xxx (2009) 1–8

**Fig. 2.** MRM chromatogram of *Gambierdiscus toxicus* (Cau Island, Binh Thuan, Vietnam) cultured at Biologische Anstalt Helgoland (33.4‰); P-CTX-3C  $m/z$  1043.5 > 1025.5, retention time (RT) = 18.8 min, P-CTX-4A/B  $m/z$  1059.5 > 1041.5, RT = 19.0 min, 2,3-dihydroxy P-CTX-3C  $m/z$  1055.5 > 1037.5, RT = 19.4.

provided by Lam Nguyen-Ngoc from Vietnam were grown at Biologische Anstalt Helgoland, Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research (AWI), Germany. The strains were cultivated in cell culture flasks (50 ml) at constant conditions. Temperature was set at 25 °C, light intensity adjusted to  $75 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  and the light/dark regime was 12:12 h. K medium was prepared as described by Keller et al. (1987). The salinity of the North Sea varies between 23 and 35‰ (Hickel, 1998), it was 33.4‰ when we have filtered the water for media preparation. Data about the salinity were taken from Helgoland Roads (North Sea, 54°11.3' N, 7°54.0' E) time series. After a growth period of several weeks we harvested *G. toxicus* cells for toxin analysis. 50 ml of Dinoflagellates cultures were filtered on 47 mm GF/C filters (Whatman, GB) under vacuum.

Furthermore, growth experiments were carried out at Institute of Oceanography, Vietnam. Stock algal cultures were kept in culture chamber with temperature  $26 \pm 0.5$  °C, light intensity of  $45 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , and light:dark cycle of 12:12 h. The natural salinity of the seawater was modified; three salinities such as 30‰, 33‰, 35‰



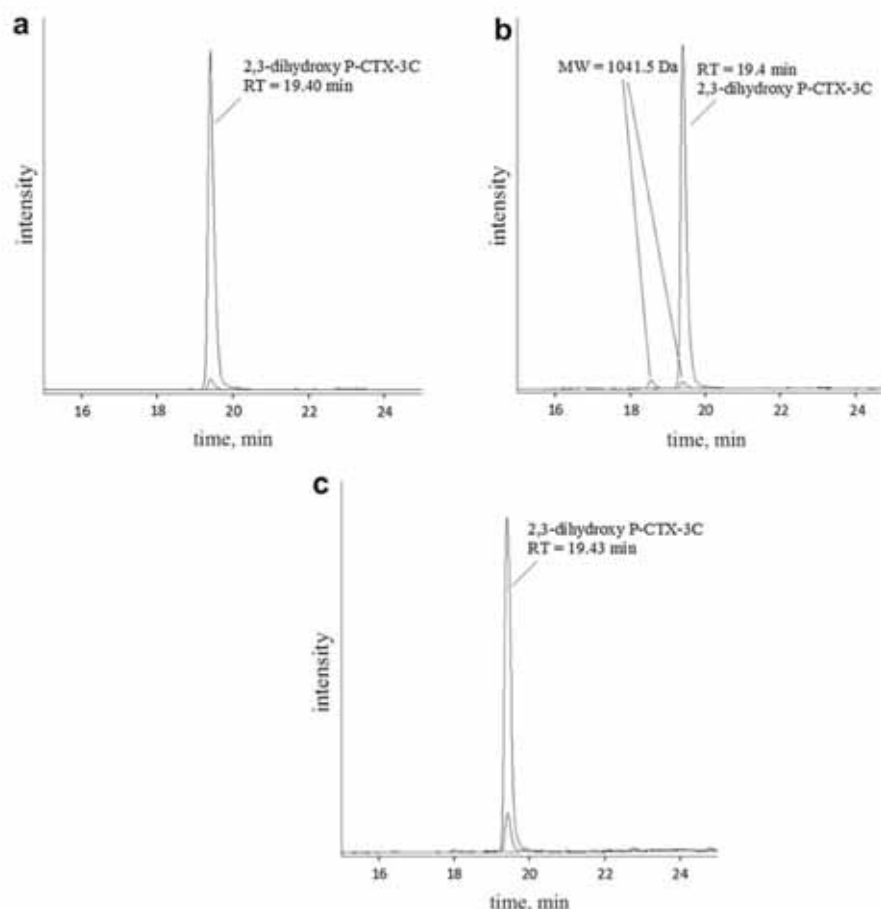
**Fig. 3.** Influence of salinity on toxin analogues in *Gambierdiscus toxicus* (Cau Island, Binh Thuan, Vietnam), cultured at 25 °C with different salinities: a) 30‰, b) 33‰, c) 35‰.

Please cite this article in press as: Roeder, K., et al., Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp., *Toxicon* (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.039

## ARTICLE IN PRESS

K. Roeder et al. / *Toxicon* xxx (2009) 1–8

5



**Fig. 4.** Analogues in strains from a) NOAA 20, Cayman island; b) NOAA 7, Mataiva and c) CCMP 1653, Hawaii, USA as an example for *Gambiendiscus* species from the Caribbean Sea, South Pacific and the North Pacific Ocean.

and 35% were conducted for experiments in February 2007.

*G. toxicus* was cultured in flask (1000 ml) with T medium (Larsen et al., 1994). Cells were harvested for toxin analyses in late exponential growth phase by filtration on a 20  $\mu$ m sieve.

In addition to those experiments, filter samples which were kindly provided by Patricia Tester and Steven Kibler from the NOAA (Table 1) were analyzed.

All filters, including NOAA, CCMP, and Vietnamese strains, were extracted with methanol/water (90:10, v/v) using an ultrasonic bath for 15 min and centrifuged at 15,000 rpm for 10 min. Extracts were filtered through 0.45  $\mu$ m nylon filter (13 mm diameter) using one-way syringe (Carl Roth GmbH & Co., Germany). Extracts were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in brown glass autosampler vials (2 ml) until measuring.

#### 2.4. LC-MS/MS analyses

HPLC was carried out with two LC-10 AT pumps (A, B), a SIL-10 AD VP Autosampler, a SCL-10 AT VP Controller, and a CTO-10 AS VP Column oven (Shimadzu GmbH, Germany). Separation was performed using Hyperclone C8 Column

(3  $\mu$ , 130  $\text{\AA}$ , 50  $\times$  2.0 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) with security guard (Phenomenex, Germany) by gradient elution at a flow of 0.3 ml min $^{-1}$ . Mobile phase consisted eluent A: 5 mM ammonium formate in acetonitrile/water (10/90) and eluent B: 5 mM ammonium formate acetonitrile/water (90/10). The gradient elution was done with 100% A for 5 min, followed by linear gradient to 60% A over 5.0 min, held over 5.0 min, and within 1.0 min to 100% B, held for 9.0 min and at least within 1.0 min back to 100% A, held for 24 min.

MS/MS analysis were carried out using Triple Quadrupole API 365 LC-MS/MS (Applied Biosystems GmbH, Germany) with electrospray ionization by ESI Turbo Ion spray Interface (SCIEX, Canada). With the following parameters: Nebulizer gas (NEB) = 13 l min $^{-1}$ , curtain gas (CUR) = 12 l min $^{-1}$ , ion spray voltage (IS) =  $-4500$  V, desolvation temperature =  $450^{\circ}\text{C}$ , collisionally activated dissociation-gas (CAD) = 4 l min $^{-1}$ , declustering potential (DP) =  $-12$  V, focussing potential =  $-180$  V, entrance potential (EP) =  $-8$  V, collision energy (CE) =  $-45$  V, collision cell exit potential (CXP) =  $-51$  V.

To determine CTXs samples were analyzed using scan mode (scan 950–1100 amu) as well as positive and negative



## ARTICLE IN PRESS

6

K. Roeder et al. / Toxicon xxx (2009) 1–8

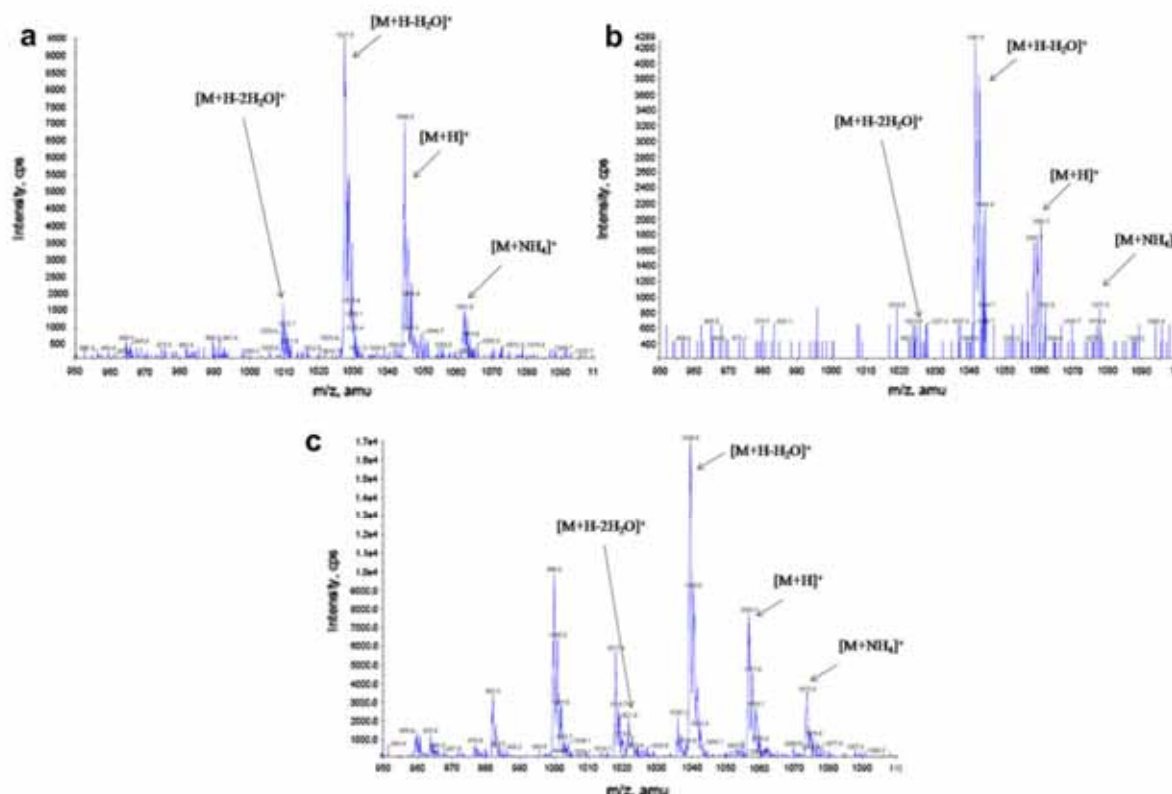


Fig. 5. Scan in positive mode of *Gambierdiscus toxicus* from Vietnam (cultured at 33°C); scan time from a) RT = 18.6–18.8 min, P-CTX-3C; b) RT = 19.0–19.1 min, P-CTX-4A/B; and c) RT = 19.2–19.5 min, 2,3-dihydroxy P-CTX-3C.

measurements in single ion monitoring (SIM) mode. Scanning in positive mode resulted in formation of ions characteristic of CTXs (Hamilton et al., 2002a,b; Pottier et al., 2002):  $[M+H]^+$ ,  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $[M+H-2H_2O]^+$  and  $[M+NH_4]^+$  (Fig. 5). Other common ions such as  $[M+H-3H_2O]^+$ ,  $[M+Na]^+$  and  $[M+K]^+$  were not present in considerable amounts.

The masses of the following toxins were selected: P-CTX-3C Molecular Weight (MW) = 1044 Da; 2,3-dihydroxy P-CTX-3C, MW = 1057 Da; 51-hydroxy P-CTX-3C, MW = 1039 Da; P-CTX 4A/B, MW = 1060; P-CTX-1, MW = 1110 Da; P-CTX-2/3, MW = 1095 Da; I/C-CTX-1, MW = 1141 and I/C-CTX-2, MW = 1141 Da (Lewis, 2001) and several ions were measured.

For each toxin two mass to charge ( $m/z$ ) ratios were selected:  $[M-H]^-$  and  $[M-H-H_2O]^-$  in negative mode as well as  $[M+H]^+$  and  $[M+H-H_2O]^+$  and in positive mode (Nicolson and Lewis, 2006; Lewis et al., 2000). After those analyses additional measurements were done in multi-reaction monitoring (MRM) mode with negative ionization. See also Figs. 2, 5 and 6 for more information of the dominant ions and their fragmentation. Because of the strong intensity of the negative molecules in the SIM mode (Fig. 6), we selected the following transitions:  $[M-H]^- > [M-H-H_2O]^-$  for P-CTX-3C  $m/z$  1043.5 > 1025.5, 2,3-dihydroxy P-CTX-3C  $m/z$  1055.5 > 1037.5, 51-hydroxy P-CTX-3C  $m/z$  1037.5 > 1019.5, and P-CTX 4A/B  $m/z$  1059.5 > 1041.5.

### 3. Results

#### 3.1. Identification

Cells are rounded with 70–83  $\mu$ m in diameter in apical, antapex view (Fig. 1e and g). The smooth thecal plates have numerous small pores (Fig. 1c–e and g). The plate formula: Po, 3', 7'', 6c, 8s, 5'', 1p and 2''' (Adachi and Fukuyo, 1979). The epitheca consists of 11 plates: Po, 3' and 7'' (Fig. 1c). Apical plate 2' is narrow subrectangular and is the broadest of the three apical plate (3') (Fig. 1c and e). The apical pore plate (Po) is oval with a fishhook shaped apical pore, it was about 9  $\mu$ m (Fig. 1a,e and f). The hypotheca contains 8 plates: 5'', 2'' and 1p (Fig. 1d), the plate 1p is broad and pentagonal with the length:width ratio is 1.2–1.3 (Fig. 1b,d and g).

#### 3.2. LC-MS/MS toxin analyses

In *Gambierdiscus* spp. several toxin analogues were detected (Table 1). The quantitative toxin amount could not be detected due to the lack of available CTX standard solution. In addition to the shown analogues, few transitions were detected which could not be safely assigned to the shown analogues.

The CTX profile of *G. toxicus* from Vietnam was characterized by the putative 2,3-dihydroxy P-CTX-3C followed by

## ARTICLE IN PRESS

K. Roeder et al. / Toxicon xxx (2009) 1–8

7

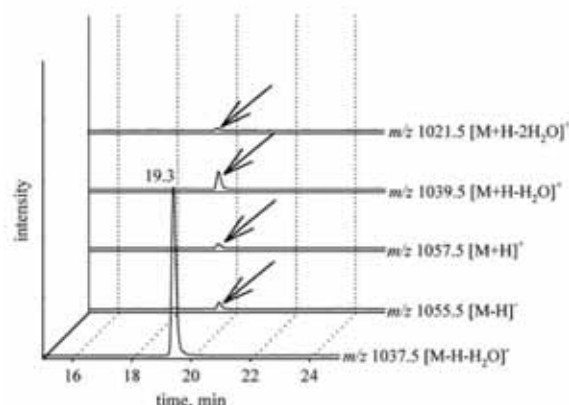


Fig. 6. Measured  $m/z$  in the Vietnamese strain cultured at Biologische Anstalt Helgoland as an example for the dominant ions in the positive and negative mode, they were assigned to 2,3-dihydroxy P-CTX-3C.

P-CTX-3C and less amounts of P-CTX-4A/B (Fig. 2). Besides, several small peaks have been found in the SIM modes and the in the scan mode. Those have to be identified in further studies. The analyses of *G. toxicus* cultivated in Vietnam showed that the ratio of the most abundant putative precursor CTXs depends on the salinity of the marine environment (Fig. 3). And looking at the toxin pattern (Figs. 2 and 3) of the cultured Vietnamese strain in different media and seawater from two different sites of the world it is evident that there was no difference between the samples depending on the different types of media. Looking at Figs. 2 and 3b and c it is obvious that the ratio of P-CTX-3C and 2,3-dihydroxy P-CTX-3C detected in the Vietnamese strain cultured at Helgoland (salinity 33.4‰) fits between the cultured cells from Institute of Oceanography, Nha Trang (salinity 30, 33, 35‰).

The strains of *Gambierdiscus* spp. from the Pacific Ocean and the Caribbean Sea (provided by CCMP and NOAA) are characterized by the putative 2,3-dihydroxy P-CTX-3C as the most abundant CTXs. Here, we did not find considerable amounts of P-CTX-3C and P-CTX-4A/B (Fig. 4). However, the strain from Belize NOAA 3 contained an additional peak of an unidentified CTX analogue, transition  $m/z$  1059.5 > 1041.5 at 17.65 min (chromatogram not shown).

#### 4. Discussion

*Gambierdiscus* spp. are known producers of precursors for CTXs. It is established that the CTXs in fish are less polar analogues compared to the precursors found in the dino-flagellates. P-CTX-3C, P-CTX-4A and putatively P-CTX-4B are known as Gambiertoxins (Lewis, 2001; Lehane and Lewis, 2000). Few studies are available about toxin pattern in *G. toxicus* and other *Gambierdiscus* spp. (Holmes et al., 1998; Durant-Clement, 1986). During the experiments new information concerning the putative GTXs produced by *Gambierdiscus* spp. from different sites of the world were obtained, whereby many strains delivered by CCMP or NOAA, USA and from Institute of Oceanography, Nha Trang in Vietnam were involved (Table 2). The LC-MS/MS analyses revealed characteristic differences between the profile of CTXs produced by the strain of *G. toxicus* from Vietnam and all other strains of *Gambierdiscus* spp. (Table 1). The strain from Vietnam formed both the putative 2,3-dihydroxy P-CTX-3C and P-CTX-3C as main components and small amounts of the putative P-CTX-4A/B. In all other strains of *Gambierdiscus* spp. only 2,3-dihydroxy P-CTX-3C could be detected in relevant amounts, whereas P-CTX-3C and P-CTX-4A/B could not be detected in important amounts. In addition, some very small peaks have been found eluting at similar retention times as the substances in the Vietnamese samples. Further studies have to be done to reconfirm those results and to detect eventually more analogues in the samples. Interestingly, the detected substance with typical MW of 2,3-dihydroxy P-CTX-3C was not reported as GTXs in previous studies (Lewis, 2001). Therefore, it has to be ensured that this substance could be surely identified as 2,3-dihydroxy P-CTX-3C. We have to ensure that the detected substance is not belonging to MTX. Several studies indicate that MTX is often produced by *Gambierdiscus* spp. in culture (Babinchak et al., 1986).

Surprisingly, the toxin pattern in *G. toxicus* from Vietnam seems to be influenced by the salinity of the culture medium (Fig. 2). Furthermore, different investigations showed a difference in the toxicity of *G. toxicus* depending on the environmental conditions like temperature, light and salinity (Morton et al., 1993; Bomber et al., 1988). But at least, less information exist about the production of precursor CTXs in the genus of *Gambierdiscus* spp. and the pathway of toxins is not clear. The reason for the influence of the salinity on the CTXs ratio could be due to a formed

Table 2

In this study analyzed species, strain denotation and origin, the asterisk denotes the species which were recently reclassified by Litaker et al., in press.

Species (isolated by)	Strain denotation	Origin
<i>G. toxicus</i>		Cau Island, Binh Tuan, South China Sea, Vietnam
<i>G. carpenteri</i> (Babinchak)	NOAA 1 (CCMP 1654)	Guam, Mariana Islands, North Pacific
<i>G. caribaeus</i> (Babinchak, J.)	NOAA 7 (CCMP1652)	Mataiva, Tahiti, South Pacific
<i>G. toxicus</i>	NOAA 5	Martinique, Lesser Antilles, Caribbean
<i>G. pacificus</i>	NOAA 9 (CCMP 1650)	Moorea, Society Islands, South Pacific
<i>G. ruetzeri</i> (Kibler, S.)	NOAA 3	South Water Cay, Belize, Caribbean
<i>G. carpenteri</i> (Villareal, T.)	NOAA 12	South Water Cay, Belize, Caribbean
<i>G. caribaeus</i> (Babinchak, J.)	NOAA 20 (CCMP 1651)	Grand Cayman Island, Caribbean
<i>G. caribaeus</i> (Durant-Clement, M)	CCMP 401	St. Barthelmy Island, Caribbean
<i>G. caribaeus</i> (Morton, S.L.)	CCMP 1733	Carry Bow Cay, Belize, Caribbean
<i>G. australes</i> (Withers, G.)	CCMP 1653	Hawaii, USA, North Pacific

Please cite this article in press as: Roeder, K., et al., Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp., Toxicon (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.039



## ARTICLE IN PRESS

8

K. Roeder et al. / Toxicon xxx (2009) 1–8

Na-chelate of 2,3-dihydroxy P-CTX-3C at higher salinities. Therefore, it could be that this isomer is more stable than P-CTX-3C. But this assumption could not yet be confirmed through any references.

Last but not the least, we have to look at the suggestion that the most abundant substance is not the putative 2,3-dihydroxy P-CTX3C. It is also possible that this detected substance could be identified as MTX in further studies. Hence, we have to find an explanation why GTXs are decreasing after culturing at a higher salinity and MTX is still produced. If this suggestion proves well-founded in further studies, we could assume that the influence of the salinity could be one of the reasons that some species of *Gambierdiscus* produce less CTXs in culture (Babinchak et al., 1986).

The next step of our analyses is to ensure the identity of the detected analogues in further investigations. Therefore, it will be of great importance to perform measurements regarding the structure of the analogues (i.e. NMR) and other measurements concerning the toxicity of the extract to reconfirm our results obtained by LC–MS/MS analyses.

### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### References

- Adachi, R., Fukuyo, Y., 1979. The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45, 67–71.
- Babinchak, J.A., Jollow, D.J., Voegtline, M.S., Higerd, T.B., 1986. Toxin production by *Gambierdiscus toxicus* isolated from the Florida Keys. *Mar. Fish. Rev.* 48, 53–56.
- Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Hurtel, J.M., Yasumoto, T., Inoue, A., 1980. Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitively involved as a causal agent. *Toxicon* 18, 199–208.
- Bomber, J.W., Morton, S.L., Babinchak, J.A., Norris, D.R., Morton, J.G., 1988. Epiphytic dinoflagellates of drift algae – another toxigenic community in the ciguatera food chain. *Bull. Mar. Sci.* 43, 204–214.
- Chinain, M., Faust, M.A., Paulliac, S., 1999. Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov. and *G. polynensis* sp. nov. *J. Phycol.* 35, 1282–1296.
- Cruz-Rivera, E., Villareal, T.A., 2006. Macroalgal palatability and the flux of ciguatera toxins through the marine food webs. *Harmful Algae* 5, 497–525.
- Dechraoui, M.Y., Naar, J., Paulliac, S., Legrand, A.M., 1999. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon* 37, 125–143.
- Durant-Clement, M., 1986. A study of toxin production by *Gambierdiscus toxicus* in culture. *Toxicon* 24, 1153–1157.
- Faust, M.A., 1995. Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *J. Phycol.* 31, 996–1003.
- Hamilton, B., Hurbungs, M., Vernoux, J.P., Jones, A., Lewis, R.J., 2002a. Isolation and characterisation of Indian Ciguatoxin. *Toxicon* 40, 685–693.
- Hamilton, B., Hurbungs, M., Jones, A., Lewis, R.J., 2002b. Multiple ciguatoxins present in Indian Ocean reef fish. *Toxicon* 40, 1347–1353.
- Hickel, W., 1998. Temporal variability of micro- and nanoplankton in the German Bight in relation to hydrographic structure and nutrient changes. *ICES J. Mar. Sci.* 55, 600–609.
- Holmes, M.J., 1998. *Gambierdiscus yasumotoi* sp. nov. (Dinophyceae), a toxic benthic dinoflagellate from southeastern Asia. *J. Phycol.* 34, 661–668.
- Holmes, M.J., Lewis, R.J., Poli, M.A., Gillespie, N.C., 1991. Strain dependent production of ciguatoxin precursors (gambiertoxins) by *Gambierdiscus toxicus* (dinophyceae) in culture. *Toxicon* 29, 761a–755.
- Keller, M.D., Selvin, R.C., Claus, W., Guillard, R.R.L., 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 23, 633–638.
- Kelly, A.M., Kohler, C.C., Tindall, R., 1990. Are crustaceans linked into the ciguatera food chain? *Environ. Biol. Fish.* 33, 275–286.
- Larsen, N.H., Moestrup, Ø., Pedersen, P.M., 1994. Catalogue 1994. Scandinavian Culture Centre for Algae and Protozoa. Department of Phycology. Botanical Institute. University of Copenhagen.
- Larsen, J., Nguyen, L.N., 2004. Potentially toxic microalgae of Vietnamese waters, Copenhagen. Opera Botanica 2004. Nordic Journal of Botany.
- Laurent, D., Yeeting, B., Labrosse, P., Gaudechoux, L., 2005. Ciguatera Field Reference Guide. Secretariat of the Pacific Community (SPC).
- Lewis, R.J., Holmes, M.J., 1993. Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 615–628.
- Lewis, R.J., Vernoux, J.P., Brereton, L.M., 1998. Structure of caribbean ciguatoxin isolated from *Caranx latus*. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5914–5920.
- Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 61–125.
- Lewis, R.J., Molgó, J., Adams, J., 2000. Ciguatera Toxins: Pharmacology of Toxins Involved in Ciguatera and Related Fish Poisonings. In: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 419–447.
- Lewis, R.J., 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicon* 39, 97–106.
- Lewis, R.J., 2006. Ciguatera: Australian perspectives on a global problem. *Toxicon* 48, 799–809.
- Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Faust, M.A., Kibler, S.R., Chinain, M., Holmes, M.J., Holland, W.C., Tester, P.A. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus* sp. nov., *Gambierdiscus carolinianus* sp. nov., *Gambierdiscus carpenteri* sp. nov., and *Gambierdiscus ruetzleri* sp. nov. (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia*, in press.
- Morohashi, A., Masayuki, S., Yasumoto, T., 1998. The absolute configuration of gambierol, a toxic marine polyether from the dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus*. *Tet. Lett.* 39, 97–100.
- Morohashi, A., Satake, M., Nagai, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., 2000. The absolute configuration of gambieric acids A–D, potent antifungal polyethers, isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron* 56, 8995–9001.
- Morton, S.L., Bomber, J.W., Tindall, D.R., Aikman, K.E., 1993. Response of *Gambierdiscus Toxicus* to Light: Cell Physiology and Toxicity. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, pp. 541–546.
- Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y., Yasumoto, T., 1989. Structure of ciguatoxin and its congener. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8929–8931.
- Murata, M., Naoki, H., Iwashita, T., Matsunaga, S., Sasaki, M., Yokayama, A., Yasumoto, T., 1993. Structure of maitotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 2060–2062.
- Nagai, H., Torigoe, K., Satake, M., Murata, T., Yasumoto, T., Hirota, 1992. Gambieric acids: unprecedented antifungal substances isolated from cultures of a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 1102–1103.
- Nicholson, G.M., Lewis, R.J., 2006. Ciguatoxins: cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. *Mar. Drugs* 4, 82–118.
- Peam, J., 2001. Neurology of ciguatera. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 70, 4–8.
- Pottier, I., Vernoux, J.P., Jones, A., Lewis, R.J., 2002. Characterisation of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon* 40, 929–939.
- Richlen, M.L., Morton, S.L., Barber, P.H., Lobel, P.S., 2008. Phylogeography, morphological variation and taxonomy of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 7, 614–629.
- Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., 1993. A new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 361–362.
- Scheuer, P.J., Takahashi, W., Tsutsumi, J., Yoshida, T., 1967. Ciguatoxin: isolation and chemical nature. *Science* 155, 1267–1268.
- Scheuer, P.J., 1994. Ciguatera and its off-shoots – chance encounters en route to a molecular structure. *Tetrahedron* 50, 3–18.
- Steidinger, K.A., Tangen, K., 1996. Dinoflagellates. In: Tomas, C.R. (Ed.), *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, p. 598.
- Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R.A., Adachi, R., 1977. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 43, 1021–1026.

Please cite this article in press as: Roeder, K., et al., Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp., *Toxicon* (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.039

#### 4 Manuskript II

### **Effects of salinity, temperature and nutrients on the yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum* in connection with the cell cycle, cell size and chlorophyll *a* concentration**

#### **Autoren:**

Karin Röder<sup>1</sup>, Gunnar Gerdt<sup>2</sup>, Florian Hantzsch<sup>2</sup>, Christina Gebühr<sup>2</sup>, Tina Helbig<sup>1</sup>, Bernd Krock<sup>3</sup>, Mona Hoppenrath<sup>4</sup>, Bernd Luckas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, LS Lebensmittelchemie, Dornburger Straße 25, 07743 Jena, Deutschland

<sup>2</sup> Biologische Anstalt Helgoland, Alfred-Wegener-Institute für Polar- und Meeresforschung, POB 180, 27498 Helgoland, Deutschland

<sup>3</sup> Alfred-Wegener-Institute für Polar- und Meeresforschung, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Deutschland

<sup>4</sup> German Centre for Marine Biodiversity Research, Forschungsinstitut Senckenberg, Südstrand 44, 26382 Wilhelmshaven, Deutschland

#### **Korrespondierender Autor:**

Karin Roeder

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, LS Lebensmittelchemie, Dornburger Straße 25, 07743 Jena, Deutschland

Tel.: +49 3641 949 653, Fax: +49 3641 949 652

E-mail address: [Karin.Roeder@uni-jena.de](mailto:Karin.Roeder@uni-jena.de)

**Abstract**

*Protoceratium reticulatum* as a producer of yessotoxin (YTX) and its analogues is common in several coastal environments. The YTX-producing strain of *P. reticulatum*, isolated from the German Bight (North Sea), was analysed to study toxin production under various autecological conditions. Experiments were carried out to investigate the influence of N/P ratio (2.44, 24.36 and 243.65), temperature (15 and 20 °C), salinity (5, 10, 15, 20, 25 and 30 ‰ salinity) and growth phase on YTX formation, cell size and chlorophyll *a* concentration. *P. reticulatum* showed the highest growth at 15 °C and higher salinities (25 and 30 ‰ salinity). In particular, higher temperature led to a reduced growth. The total YTX concentrations were higher at lower temperature. However, a clear correlation between salinity and YTX production was not observed at lower temperature. Furthermore, P-limited and control cultures exhibited the highest cell quota of YTX at the end of the stationary phase; a dramatic effect occurred at 15 °C under P-limitation, when the toxicity increased to ten fold higher values. Slight variations of the composition of the YTX analogues under nutrient limitation were observable. In addition, the results indicate that N-limitation cause a lower cell size, whereas P-limitation leads to a higher cell size; an influence of the salinity on cell size was also observable.

Keywords: YTX; carboxy yessotoxin; keto yessotoxin; formation in dependency on nutrients; salinity and temperature; *Protoceratium reticulatum*; *Gonyaulax grindleyi*; LC-MS/MS analyses; chlorophyll *a*; *in vivo* fluorescence

## 1. Introduction

Yessotoxin (YTX), a disulphated polyether toxin was first isolated by Murata et al. (1987) from digestive glands of Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*). Three species of dinoflagellates were identified as YTX producing organisms, these are *Protoceratium reticulatum* (Claparède & Lachmann) Bütschli (syn.: *Gonyaulax grindleyi*) (Satake et al., 1997), *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge (syn.: *Gonyaulax polyedra*) (Tubaro et al., 1998, Draisci et al., 1999) and *Gonyaulax spinifera* (Claparède & Lachmann) Diesing (Rhodes et al., 2006, Riccardi et al., 2009). Meanwhile, the production of YTX by the dinoflagellate *P. reticulatum* has been reported in New Zealand, Japan, Norway, UK, Canada, USA, Chile, Spain, Italy, and Africa (Ciminiello et al., 2003, Finch et al., 2005, Krock et al., 2006 and 2009, Paz et al., 2004, 2006, 2007, Ramstad et al., 2001, Samdal et al., 2004, Satake et al., 1997, 1999, 2006, Stobo et al., 2005).

Different concentrations of YTX were found in cultures of dinoflagellates around the world. The toxicity of *P. reticulatum* reached from 0.9 to 79 pg YTX cell<sup>-1</sup> (Eiki et al., 2005, Howard et al., 2008, MacKenzie et al., 1998, Mitrovic et al., 2005, Paz et al., 2004 and 2007, Samdal et al., 2004, Satake et al., 1996 and 1999), and the concentrations of YTX in *L. polyedrum* were up to 1.5 pg YTX cell<sup>-1</sup>, and in *G. spinifera* up to 200 pg YTX cell<sup>-1</sup> (Draisci et al., 1999, Howard et al., 2008, Paz et al., 2004, Ramstad et al., 2001, Rhodes et al., 2006, Tubaro et al., 1998). It seems that the principal toxin formed by *P. reticulatum* is YTX, even though some strains contained homoYTX as prominent analogue (Paz et al., 2008). From about 100 known YTX analogues only 40 % are characterized concerning their exact chemical structure (Miles et al., 2004, 2005a, 2005b, 2006a, 2006b, Paz et al., 2008). Suzuki et al. (2007) reported on *P. reticulatum* strains isolated at different sites of Japanese coasts (e.g. Mutsu Bay and Okirai Bay) which produced 45,46,47-trinoryessotoxin (trinorYTX), 1-homoyessotoxin (homoYTX), 45,46,47-trinor-1-homoyessotoxin besides YTX. In some strains 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxoyessotoxin (noroxoYTX enone; ketoYTX) was also detected, and some of those strains exhibited a percentage of YTX analogues near to 50 % of the total YTX concentration (Suzuki et al., 2007).

Environmental conditions are important for the production of toxins by dinoflagellates. However, only few studies are published how environmental factors might affect the YTX formation of *P. reticulatum*. Gallardo Rodríguez et al. (2009) and Guerrini et al. (2007) reported about the requirements of macronutrients; the effect of micronutrients was

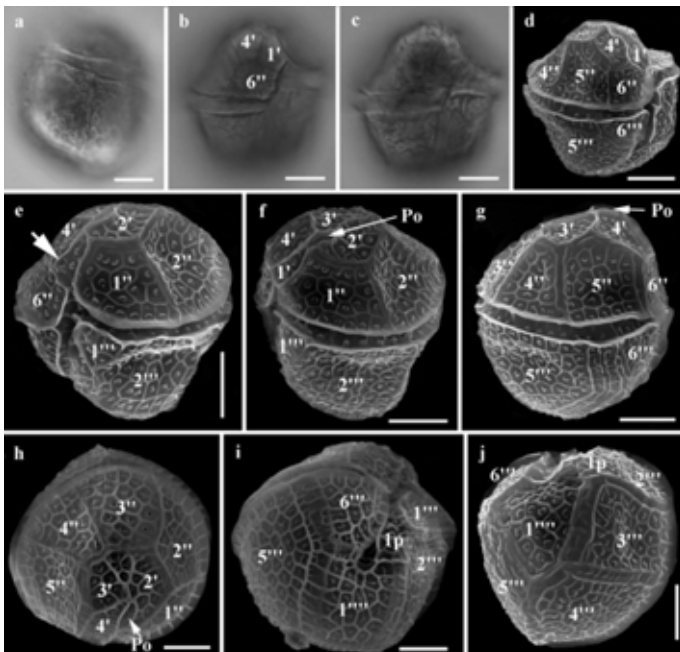
investigated by Mitrovic et al. (2004) and some data are available on the influence of temperature and salinity on the YTX-production (Guerrini et al., 2007).

Our investigations were directed on the elucidation of the effect of various growth factors on formation of YTXs in a strain of *P. reticulatum* from the North Sea (Helgoland Roads) for better assessment of the risk for toxic dinoflagellate events in the North Sea connected with climate change or eutrophication. Therefore, the isolated strain of *P. reticulatum* was cultured at different conditions concerning macronutrients, salinity and temperature.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Isolation and identification of *P. reticulatum*

Net samples from surface water at Helgoland Roads, German Bight, North Sea, Germany, were collected during a taxonomic phytoplankton re-investigation project (Hoppenrath, 2004, Hoppenrath et al., 2009). *P. reticulatum* cells were isolated by micropipetting from a mixed net-sample in April 2003, washed in sterile fine-filtered seawater and maintained in f/2 medium (Guillard, 1975) in plastic Petri dishes. After culture establishment tissue flasks



were used. The original culture is available at the German Centre of Marine Biodiversity Research, Wilhelmshaven, from M. Hoppenrath. The species was identified under the light microscope by its characteristic cell shape, size, and thecal ornamentation (Fig. 1a-c). The species identification was verified by scanning electron microscopy (Figs 1d-j).

Figure 1: Light (a-c) and scanning electron (d-j) micrographs of *Protoceratium reticulatum* from the used culture. a) Left lateral view showing the thecal ornamentation. b) Ventral surface view showing the cingulum displacement. c) Ventral view in deeper

## 2.2. Media preparation, culture conditions and determination of the cell growth

The *P. reticulatum* strain was maintained in 500 ml borosilicate flasks in f/2 medium without silicate (Guillard, 1975) at  $70\text{--}90\ \mu\text{mol s}^{-1}\text{ m}^{-2}$ ,  $14^\circ\text{C}$  and 12:12 h light/dark regime in 30 ‰ salinity natural seawater.

The influence of the salinity on the YTX production was estimated at six salt concentrations. Therefore, the natural seawater of the North Sea, which had the original salinity of 30 ‰ salinity, was diluted with fresh water to the following concentrations: 5, 10, 15, 20 and 25 ‰ salinity. These five dilutions and the natural seawater were prepared as f/2 media without silicate, described by Guillard (1975). For nutrient limitation f/2 media were prepared containing three compositions of nutrients. First nutrient sufficient medium (also referred to as control, C) containing the original concentration of nutrients in the f/2 medium, second f/2 medium with ten times less phosphorus (1/10 P) and third f/2 medium with ten times less nitrogen (1/10 N) (Tab. 1). The pH-value was adjusted to  $7.6 \pm 0.02$  using HCl and the media were incubated in thermo stated rooms at  $15^\circ\text{C}$  and  $20^\circ\text{C}$ , respectively. The light/dark regime and the light intensity were retained unchanged.

Table 1: Molar concentration and proportion of macronutrients in the Final Media.

Component	Molar Concentration in Final Media		
	Control	1/10 N	1/10 P
$\text{NO}_3^-$	$8.82 \times 10^{-4}\text{ M}$	$0.882 \times 10^{-4}\text{ M}$	$8.82 \times 10^{-4}\text{ M}$
$\text{PO}_4^{3-}$	$3.62 \times 10^{-5}\text{ M}$	$3.62 \times 10^{-5}\text{ M}$	$0.362 \times 10^{-5}\text{ M}$
N/P	24.36	2.44	243.65

Three replicates of each limitation were incubated in Erlenmeyer flasks (1 l) which were inoculated with 1 ml of a late exponential stock culture of *P. reticulatum* and contained  $11\text{ cells ml}^{-1}$  on day of inoculation. In addition, we took 10 ml of the inoculum for toxin determination ( $n=3$ ). Therefore, the subsamples were filtered through GF/C filters (Carl Roth GmbH & CO, Germany) under slight vacuum pressure.

The growth curves were determined by measurement of the *in vivo* fluorescence followed by successive cell counting of *P. reticulatum* in 3-day intervals ( $n=3$ ). 1 ml of the culture was immediately measured by a fluorescence spectrophotometer (Cary Eclipse, Varian Inc., USA) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 685 nm. In addition, cells were counted using a Sedgewick rafter with a light microscope



(10 fold magnification), a minimum of 400 cells were counted. Specific growth rate ( $\mu$  [ $\text{day}^{-1}$ ]) was calculated using the equation by Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{t_1 - t_0}$$

$N$  is cell density at a given time ( $t$ ).

### 2.3. Sampling in the exponential and the stationary growth phase

For further analyses additional samples were taken in the exponential and stationary growth phase. Chlorophyll  $a$  concentration was determined using subsamples of 25 ml which were analysed as triplicate *in vivo* by the multialgal fluorimeter (BBE Moldaenke, Germany). This fluorometer allows determination of different algae classes: green (chlorophyceae), blue-green (cyanophyceae), brown (diatoms and dinophyceae) and cryptophyceae. The emission of the pigments after excitation at characteristic wavelengths was measured. Thus, the chlorophyll  $a$  concentration and other pigments [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ] were determined for all living cells.

For determination of cell size and morphology, subsamples of 50 ml were analysed using the Flow CAM (Fluid Imaging Technologies, USA, further details see Sieracki et al., 1998). For most of the samples, depending on cell density, a minimum of 400 cells were measured. Particles from 5 to 100  $\mu\text{m}$  were measured using a 20 x objective and a flow cell of 100  $\mu\text{m}$  in depth. Consequently, information about the cell diameter, volume, length and width of each measured cell were obtained. The YTX concentration was determined by LC-MS/MS (see below).

### 2.4. Extraction of yessotoxins and measurement by LC–MS/MS

Cultures were filtered on GF/C filter (Whatman, GB) under slight vacuum, 100 ml in the exponential growth phase and 300 ml in the stationary phase, respectively. Filters were extracted with methanol (MeOH) using an ultrasonic probe for 30 sec and an ice-cooled ultrasonic bath for 30 min, afterwards they were centrifuged at 14.000 x g for 10 min. The supernatant was stored and the filters were extracted again with MeOH using the ultrasonic bath (30 min), followed by centrifugation at 14.000 x g for 10 min. Supernatants were combined evaporated to dryness using a heating block (40 °C) under nitrogen stream. Dried samples were dissolved in 1 ml MeOH, admitted to 2 ml single-use syringes and filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filters (Carl Roth GmbH & CO, Germany).

100 ml of the culture filtrates were stored in 100 ml flasks (Kautex, Germany) for measuring of released YTX in the culture media. The flasks were stored at -20 °C until further purification. Subsequently, the filtrates were loaded on prepared Chromabond C18ec cartridges (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany). Those were equilibrated with 3 ml MeOH and 3 ml of deionised water (Synergy Water Purification System, Millipore). Afterwards the culture filtrates (100 ml) were loaded on the cartridge, washed with 3 ml of deionised water and then eluted with 3 ml MeOH. The MeOH was evaporated to dryness under nitrogen stream and samples were dissolved in 1 ml MeOH and filtered through 0.45 µm nylon filters. All samples were stored at -20 °C in brown autosampler vials until measuring by LC-MS/MS.

Certified YTX standard solution, dissolved in MeOH, was obtained from the National Research Council (NRC) Canada (Halifax, Canada). The LC-MS/MS measurements were carried out as described earlier (Roeder et al., submitted). Liquid chromatography was performed using Hyperclone C8 Column (3 µm, 130 Å, 50 x 2.0 mm) with security guard (Phenomenex, Germany) by gradient elution at a flow of 0.3 ml min<sup>-1</sup>. Mobile phase consists of eluent A: 5 mM ammonium formate in acetonitrile/water (10:90) and of eluent B: 5 mM ammonium formate in acetonitrile/water (90:10). The gradient elution was done with 100 % A for 1.5 min, followed by linear gradient to 40 % A over 3.5 min, held over 5.0 min, and within 1.0 min to 100 % B, held for 9.0 min and at least within 1.0 min back to 100 % A, held for 24 min. MS/MS analyses were performed using a Triple Quadrupole API 365 LC-MS/MS (Applied Biosystems GmbH, Germany) with electrospray ionisation by ESI Turbo Ion spray Interface (SCIEX, Canada). Analyses were carried out in multi reaction monitoring (MRM) mode with negative ionization; selected transitions ([M-H]<sup>-</sup>>[M-H-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>: YTX *m/z* 1141.5>1061.5, homoYTX *m/z* 1155.5>1075.5, 45-OH-YTX *m/z* 1157.5>1077.5, carboxyYTX *m/z* 1173.5>1093.5, the putative 45-OH-carboxyYTX *m/z* 1189.8>1109.5, *m/z* 1047.5>967.5 (probably ketoYTX) and *m/z* 1191.5>1111.5. YTX concentrations were determined by a three point calibration curve using dilutions of a certified YTX standard solution (NRC, Halifax, Canada). Concentrations of the YTX analogues were expressed as YTX equivalents.

### 3 Results

#### 3.1 Identification of *P. reticulatum*

Chloroplasts color the cells golden-brown. The cingulum is nearly median and descending about one cingular width without overlap (Figs 1b, c). Cells are slightly laterally compressed. *P. reticulatum* is photosynthetic, has a strongly ornamented theca (Figs 1d-j) and this characteristic reticulation with one or two pores inside each reticulation subunit can hide the sutures so that it can be difficult to recognize the plate borders. The plate pattern was discerned as Po 4' 6'' 6''' 1p 1'''' as has been described before (Figs 1d-j). Some cells had a different epithecal plate pattern with 3' and 1a, this variability is also known from the literature. The first apical plate has a ventral pore at its right margin (Fig. 1e). The pore plate is narrow and elongated (Figs 1f-h). For further information see material and methods section.

#### 3.2 Growth of *P. reticulatum*

*P. reticulatum* cells cultured at 5 and 10 ‰ salinity died in all cases short time after inoculation. Highest cell concentration was observed in the control at 15 °C at salinities of 25 and 30 ‰. Culturing at 20 ‰ salinity or below decreased the growth strongly (Fig. 2a, Tab. 2). Furthermore, cells cultivated at 15 °C under N-limitation reached the stationary phase faster than those cultured in nutrient sufficient media and the absolute cell number was also lower. The influence of the salinity on growth in N-limited media was not so high; cells cultured at 20, 25 and 30 ‰ salinity had almost the same maximum of cells (Fig. 2b, Tab. 2). *P. reticulatum* cultivated in P-limited media reached the stationary phase faster, with low growth at 20, 25 and 30 ‰ salinity and lowest growth at 15 ‰ salinity (Fig. 2c).

Table 2: Maximum of absolute cell counts of *P. reticulatum* cultured at 15 and 20° C at different salinities and under different limitations (n=3).

Temperature	Salinity	Limitation					
		Control		1/10 N		1/10 P	
		Day	Cells ml <sup>-1</sup>	Day	Cells ml <sup>-1</sup>	Day	Cells ml <sup>-1</sup>
15 °C	15	39	1963 ± 261	39	2403 ± 763	27	239 ± 49
	20	39	3776 ± 1050	27	6518 ± 663	21	437 ± 108
	25	36	13050 ± 1329	30	5921 ± 372	21	444 ± 79
	30	39	12367 ± 513	24	5008 ± 606	21	370 ± 164
20 °C	15	24	149 ± 41	30	206 ± 27	24	106 ± 9
	20	33	2787 ± 196	30	5069 ± 428	18	604 ± 149
	25	30	6257 ± 792	30	6604 ± 327	18	535 ± 141
	30	36	5500 ± 429	30	5771 ± 474	21	566 ± 566

The same influence of the salinity on growth of *P. reticulatum* was observed in the control at

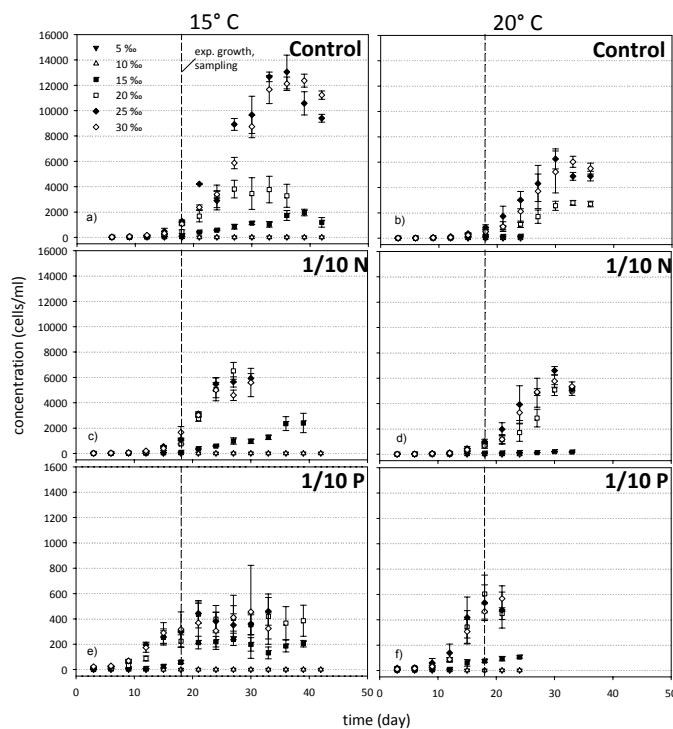


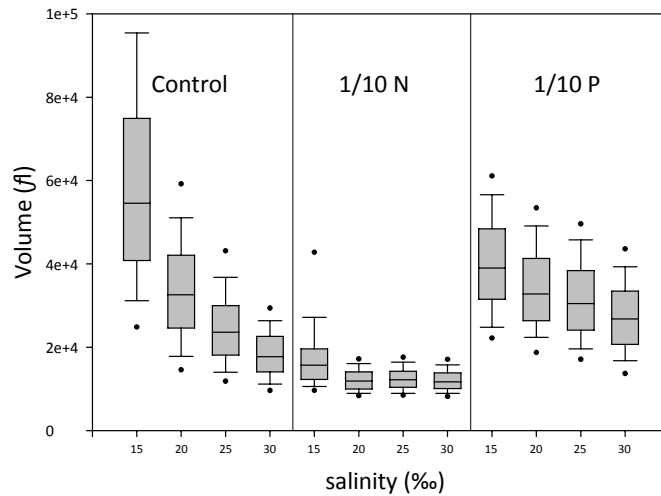
Figure 2: Growth curves of *P. reticulatum* cultured at different salinities in f/2-media: a) 15 °C, nutrient sufficient, b) 20 °C, nutrient sufficient, c) 15 °C, nitrogen limited, d) 20 °C, nitrogen limited, e) 15 °C, phosphorous limited, f) 20 °C, phosphorous limited. The error bars represent standard error (n=3). Displayed growth curves are based on cell counting by Sedgwick Rafter's counting chamber.

### 3.3. Variation of cell size and morphology

The influence of nutrient limitation, salinity and temperature on cell size and morphology was investigated; therefore characteristics of *P. reticulatum* during exponential and stationary phase were compared. No changes of cell size or morphology were found in nutrient sufficient media at 30 ‰ salinity. Thus, this culture acts as reference to compare the influence of nutrient limitation and salinity. The strongest changes of the cell size depending on nutrient limitation and salinity were observed in the stationary phase, but a trend was already visible in the exponential growth phase (data not shown). In general an increase of cell size during culturing was observed in the control media at 15 and 20 ‰ salinity and in P-limited media, whereas the cell size was highest in low salinity cultures in the stationary phase. At 25 ‰ salinity no evident difference was found in nutrient sufficient media. In P-limited cultures the cell sizes were generally higher and the lowest cell sizes were observed in cultures with N-limited media, whereas in both limitations the influence of

15 and 20 °C, but the maximum cell counts were higher at 15 °C (Figs 2a, b, Tab. 2). Higher temperature caused no differences in growth between nutrient sufficient and N-limited cells (Figs 2b, d). Differences between N-limited cultures at 15 and 20 °C were not obvious, except for cells cultured at 15 ‰ salinity showed a higher growth rate at 15 °C. Also the growth of P-limited cultures was low at 15 and 20 °C (Figs 2c, f). Growth rates ranged from 0.21 to 0.35 day<sup>-1</sup>.

the salinity was less important (Fig. 3). A similar pattern was also observed at 20 °C, even if



the differences in-between limitations or within one limitation between the salinities were not that clear. It was evident that cells cultured at higher temperature showed strong changes of morphology in the stationary phase.

Figure 3: Volume (fl) of *P. reticulatum* (15°C) cultured at different salinities in the stationary phase; control (f/2-media), 1/10 N (N-limited), 1/10 P (P-limited); the error bars represent the standard error (n=400).

### 3.4. Chlorophyll *a* concentration

Differences of chlorophyll *a* cell quota were observed in *P. reticulatum*. Generally, the concentrations of chlorophyll *a* cell<sup>-1</sup> increased with lower salinity in nutrient sufficient and in P-limited cultures. This effect was strongest in the exponential growth phase. However, the same clear trend was not observed in nutrient sufficient culture media in the stationary phase and in P-limited cultures as the slope of chlorophyll *a* concentration with lower salinities seems to be almost constant in the exponential and stationary phase (Fig. 4).

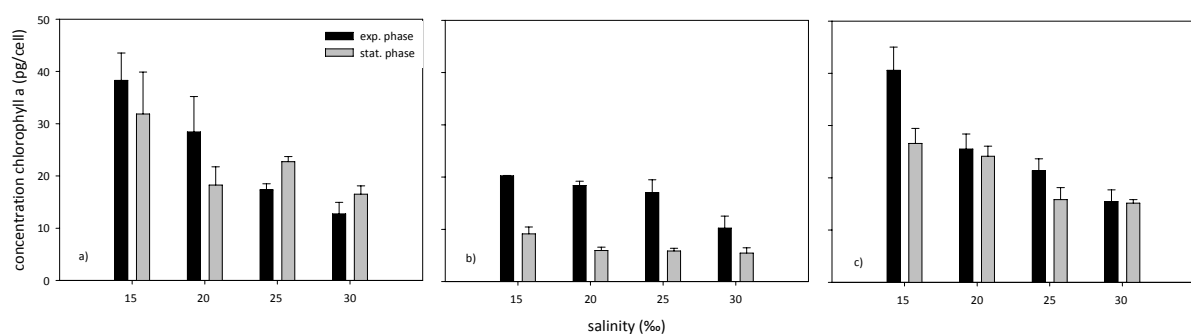


Figure 4: Chlorophyll *a* concentration (pg/cell) in *P. reticulatum* (15°C) cultured at different salinities; a) nutrient sufficient, b) nitrate limitation, c) phosphate limitation; the error bars represent standard error (n=3).

The differences of control and P-limited to N-limited cultures are evident; all concentrations of chlorophyll *a* in N-limited cultures were low in the exponential growth phase and lower in the stationary phase. Fig. 4 displays the concentration of chlorophyll *a* cell<sup>-1</sup>. To exclude the

potential influence of cell size on the chlorophyll *a* concentration, the ratio of diameter to chlorophyll *a* concentration was also calculated and the pattern did not change.

### 3.5. YTX concentration in *P. reticulatum* cells

YTX was the main analogue with a relative amount of more than 94 % of all YTXs and a total concentration of  $7.22 \pm 0.20$  pg YTX cell<sup>-1</sup> in the late exponential stock culture of *P. reticulatum*. In addition, low amounts of the putative carboxyYTX ( $0.22 \pm 0.05$  pg YTX eq. cell<sup>-1</sup>) and the putative ketoYTX ( $0.19 \pm 0.05$  pg YTX eq. cell<sup>-1</sup>) were detected in the inoculum (Tab. 3).

Table 3: Concentration of YTXs (pg/cell) in *P. reticulatum* cultured at different salinities and two different temperatures; on top: at 15 °C, bottom: at 20 °C, n.d. → not detected, lower than LOD

Analogue									
Strain	Temp.	Limitation	Salinity (%)	YTX ( <i>m/z</i> 1141.5>1061.5)		COOH YTX ( <i>m/z</i> 1173.5>1093.5)		keto YTX ( <i>m/z</i> 1047.5>967.5)	
				exp. Phase	stat. Phase	exp. Phase	stat. Phase	exp. Phase	stat. Phase
				Toxin concentration in pg/cell (SD)					
<i>P. reticulatum</i> Helgoland	15°C	Inoculum Control	30	7.22 (± 0.20)		0.22 (± 0.05)		0.19 (± 0.05)	
			15	10.28 (± 3.45)	14.23 (± 1.51)	n.d.	0.34 (± 0.19)	n.d.	0.58 (± 0.25)
			20	8.41 (± 2.09)	15.39 (± 2.71)	n.d.	0.16 (± 0.04)	n.d.	0.05 (± 0.02)
			25	3.90 (± 0.32)	11.29 (± 0.77)	n.d.	0.06 (± 0.01)	n.d.	0.14 (± 0.02)
		1/10 N	30	4.02 (± 0.68)	11.53 (± 1.81)	n.d.	0.07 (± 0.01)	n.d.	0.08 (± 0.03)
			15	13.51 (± 2.01)	6.27 (± 3.71)	n.d.	0.13 (± 0.08)	n.d.	0.12 (± 0.05)
			20	6.98 (± 0.94)	4.56 (± 1.33)	n.d.	0.12 (± 0.02)	n.d.	0.08 (± 0.01)
			25	6.43 (± 1.21)	5.89 (± 0.42)	n.d.	0.15 (± 0.01)	n.d.	0.08 (± 0.02)
		1/10 P	30	4.14 (± 1.28)	5.12 (± 1.15)	n.d.	0.21(± 0.03)	n.d.	0.07(± 0.02)
			15	24.13 (± 4.08)	50.66 (± 3.27)	n.d.	1.26 (± 0.74)	n.d.	0.82 (± 0.15)
			20	25.29 (± 6.63)	50.06 (± 19.49)	n.d.	0.58 (± 0.10)	n.d.	0.57 (± 0.19)
			25	19.38 (± 3.15)	56.53 (± 19.40)	n.d.	0.90 (± 0.11)	n.d.	0.39 (± 0.05)
			30	17.13 (± 1.28)	46.42 (± 3.97)	n.d.	1.01 (± 0.13)	n.d.	0.63 (± 0.14)
Analogue									
Strain	Temp.	Limitation	Salinity (%)	YTX ( <i>m/z</i> 1141.5>1061.5)		COOH YTX ( <i>m/z</i> 1173.5>1093.5)		keto YTX ( <i>m/z</i> 1047.5>967.5)	
				exp. Phase	stat. Phase	exp. Phase	stat. Phase	exp. Phase	stat. Phase
				Toxin concentration in pg/cell (SD)					
<i>P. reticulatum</i> Helgoland	20°C	Inoculum Control	30	7.22 (± 0.20)		0.22 (± 0.05)		0.19 (± 0.05)	
			15	3.35 (± 1.76)	3.45 (± 0.73)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			20	3.28 (± 0.78)	4.92 (± 0.83)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			25	5.47 (± 3.14)	11.03 (± 2.56)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		1/10 N	30	8.91 (± 3.24)	12.23 (± 2.06)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			15	1.86 (± 0.11)	4.16 (± 0.61)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			20	3.38 (± 0.21)	2.96 (± 0.32)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			25	5.75 (± 1.51)	7.27 (± 0.35)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		1/10 P	30	7.77 (± 1.19)	9.45 (± 0.86)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			15	3.41 (± 1.33)	3.47 (± 0.61)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			20	3.48 (± 0.69)	8.50 (± 0.81)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			25	7.15 (± 1.97)	17.89 (± 0.29)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	11.74 (± 2.39)	16.13 (± 2.51)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

The YTX cell quotas of *P. reticulatum* cultured at 15 °C (in f/2-media at different salinities) were not homogenous in the exponential growth phase. The concentrations of YTX in cells cultured in nutrient sufficient media at lower salinities increased slightly from  $7.22 \pm 0.20$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (inoculum) to  $10.28 \pm 3.45$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (15 ‰ salinity) and to  $8.41 \pm 2.09$  pg YTX/cell (20 ‰ salinity). On the other hand, the concentrations of YTX, cultured in the same medium at higher salinities, decreased during the exponential growth

phase from  $7.22 \pm 0.20$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (inoculum) to  $3.90 \pm 0.32$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (25 ‰ salinity) and to  $4.02 \pm 0.68$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (30 ‰ salinity). A decrease of the YTX cell quota in the exponential growth phase with increasing salinity was also observed under N-limitation. The concentrations of YTX in N-limited cells were generally lower compared to the YTX concentration in cells of the late exponential inoculum. Only cells cultured at 15 ‰ salinity contained a higher YTX cell quota ( $13.51 \pm 2.01$  pg YTX cell<sup>-1</sup>). With higher salinity the YTX concentrations decreased subsequently to  $6.98 \pm 0.94$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (20 ‰ salinity),  $6.43 \pm 1.21$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (25 ‰ salinity) and  $4.14 \pm 1.28$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (30 ‰ salinity). However, the highest YTX concentrations cell<sup>-1</sup> in the exponential growth phase were observed in cultures under P-limitation. The YTX concentrations tended to a decrease by higher salinity also in P-limited cultures (Tab. 3). The YTX concentrations in the P-limited cells were:  $24.13 \pm 4.08$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (15 ‰ salinity),  $25.29 \pm 6.63$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (20 ‰ salinity),  $19.38 \pm 3.15$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (25 ‰ salinity) and  $17.13 \pm 1.28$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (30 ‰ salinity).

In contrast to the YTX concentrations during the exponential growth phase, a different pattern was observed during the stationary phase. It was evident, that the YTX concentration in *P. reticulatum* cultured in medium containing sufficient nutrients in the stationary phase was higher than the YTX concentration during the exponential growth phase. *P. reticulatum* cells cultured at 15 and 20 ‰ salinity had almost the same YTX concentration ( $14.23 \pm 1.51$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (15 ‰ salinity),  $15.39 \pm 2.71$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (20 ‰ salinity)) and this result was also obtained for 25 and 30 ‰ salinity with YTX concentrations  $11.53 \pm 1.81$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (25 ‰ salinity) and  $11.53 \pm 1.81$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (30 ‰ salinity). Cells cultured under N-limitation contained less YTX cell<sup>-1</sup> compared to the inoculum of late exponential *P. reticulatum*. Otherwise, P-limited cultures contained extremely high YTX concentrations:  $50.66 \pm 3.27$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (15 ‰ salinity),  $50.06 \pm 19.49$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (20 ‰ salinity),  $56.53 \pm 19.40$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (25 ‰ salinity) and  $46.42 \pm 3.97$  pg YTX cell<sup>-1</sup> (30 ‰ salinity) (Fig. 5, Tab. 3).

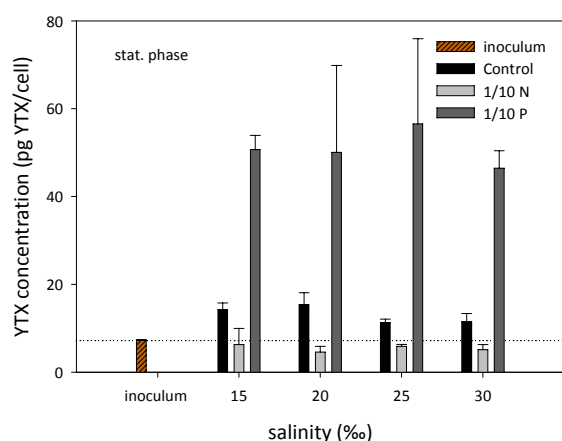


Figure 5: Concentration of YTX ( $m/z$  1141.4>1061.5) in *P. reticulatum* (15°C) in the stationary phase; control (f/2-media), 1/10 N (N-limited), 1/10 P (P-limited), the error bars represent standard error (n=3).

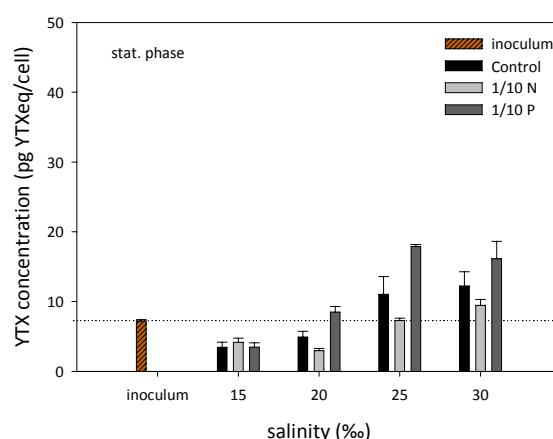


Figure 6: Concentration of YTX ( $m/z$  1141.4>1061.5) in *P. reticulatum* (20°C) in the stationary phase; the YTX concentration for the inoculums is shown, control (f/2-media), 1/10 N (N-limited), 1/10 P (P-limited), the error bars represent standard error (n=3).

Cultivation at higher temperature (20 °C) led to an increase of YTX concentrations cell<sup>-1</sup> when grown at higher salinities. However, the YTX concentrations were low when cultures were grown at 15 and 20 ‰ salinity. This was obvious for most of the samples during the exponential and stationary phase (Fig. 6). Generally, N-limited cultures contained the lowest

and P-limited cultures the highest YTX concentration cell<sup>-1</sup>.

Cell quotas of YTX analogues (carboxyYTX and ketoYTX) of cells cultivated at 15 °C in the stationary phase are plotted in Tab. 3. The concentrations of both YTX and the YTX analogues were enhanced under P-limited conditions. Compared to the inoculum the concentrations of the YTX analogues decreased in the media with sufficient nutrients, except that the concentration of YTX analogues increased in the nutrient sufficient media when cultured at 15 ‰ salinity (Fig. 7).

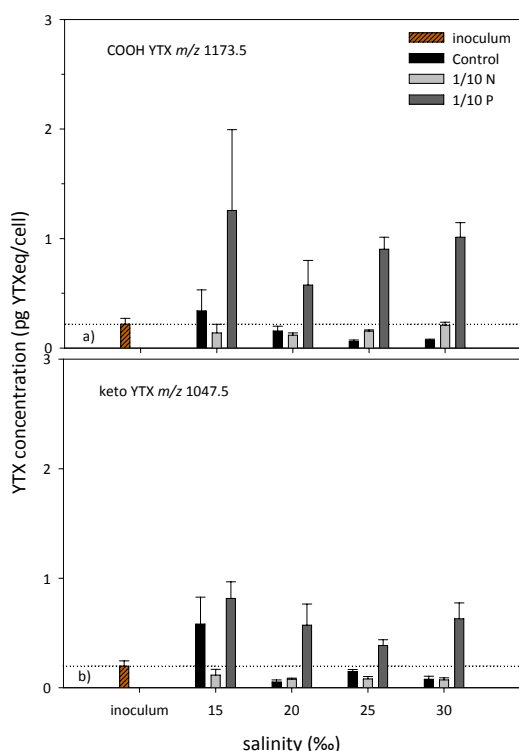


Figure 7: Concentration of COOH YTX ( $m/z$  1173. >1093.5) and keto YTX ( $m/z$  1047.5> 967.5) in *P. reticulatum* (cultured at 15°C) in the stationary phase; the error bars represent standard error (n=3).



Due to the lower concentration of YTXs and partly lower amount of cells resulting in an YTX cell quota below LOQ, it was not possible to interpret detected amount of YTXs in the cells cultured at 20 °C. In addition, we detected differences in the pattern of YTXs under different limitations independent of the salinity (Fig. 8).

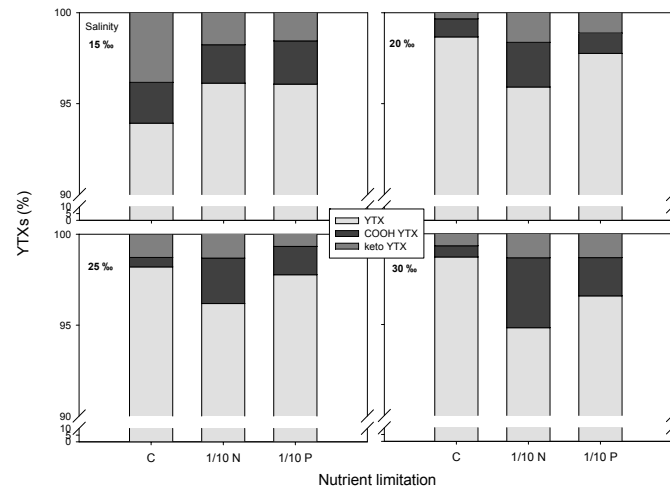


Figure 8: Percentage of YTX and its analogues (COOH YTX and keto YTX) in the stationary phase (15 °C) at different salinities in dependence of the nutrient limitation.

### 3.6. Extracellular YTX concentration

The YTX concentrations were calculated as YTX ml<sup>-1</sup>filtrate. The results were normalized to the cell concentrations for comparison of intracellular and extracellular quota of YTX, which was found in the filtrate of all cultures. Generally, the concentration of YTX (normalized to

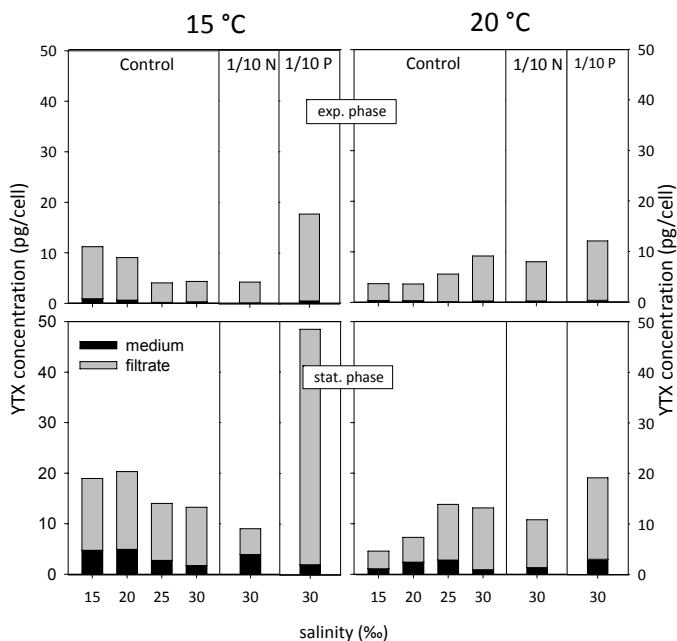


Figure 1: Concentration of YTX ( $m/z$  1141.4>1061.5) in the culture filtrate (15 °C) in the exponential and the stationary phase. Concentrations in the filtrate were related to the cells/ml (as an indicator).

the cell counts) in the filtrate was lower with lower cell concentrations, especially during the exponential growth phase. However, during the stationary phase the YTX concentration cell<sup>-1</sup> in the filtrate increased in all samples (Fig. 9). In addition, a slight decrease of the YTX cell quota was observed with increasing salinity. Higher temperature during cultivation resulted also in a partly different excretion of YTX.

#### 4. Discussion

*P. reticulatum* is common in different geographical areas all over the world and many reports exist about accumulation of YTX in several molluscan shellfish species (e.g. Aasen et al., 2005, Ciminiello et al., 1997 and 2003, Finch et al., 2005, Krock et al., 2006, MacKenzie et al., 1998, Paz et al., 2004, 2006, 2007 and 2008, Ramstad et al., 2001, Samdal et al., 2004, Satake et al., 1997, 1999, 2006, Stobo et al., 2005, Suzuki et al., 2007, Yasumoto & Takizawa, 1997). The *P. reticulatum* strain used in this study was isolated in the North Sea and identified as YTX producer (Hoppenrath, 2004). Up to now no serious accumulation of YTXs in shellfish species was reported in the German Bight. However, the presence of *P. reticulatum* in the North Sea plankton necessitates investigations with focus on the potential risk of blooms of this dinoflagellate.

##### 4.1. Application of *in vivo* fluorescence for determination of cell growth

The determination of the growth of *P. reticulatum* by calibration of the fluorimeter was difficult due to differing chlorophyll *a* concentrations cell<sup>-1</sup> and varying cell size (Fig. 4). Previous publications reported good correlation between fluorescence to cell counts when salinity and nutrient concentrations were modified (Lim & Ogata, 2005; Parkhill & Cembella, 1999). In this investigation the relation of *in vivo* fluorescence to the absolute cell number was linear for the calibration with diluted stock cultures but not linear over the whole growth period (Fig. 10).

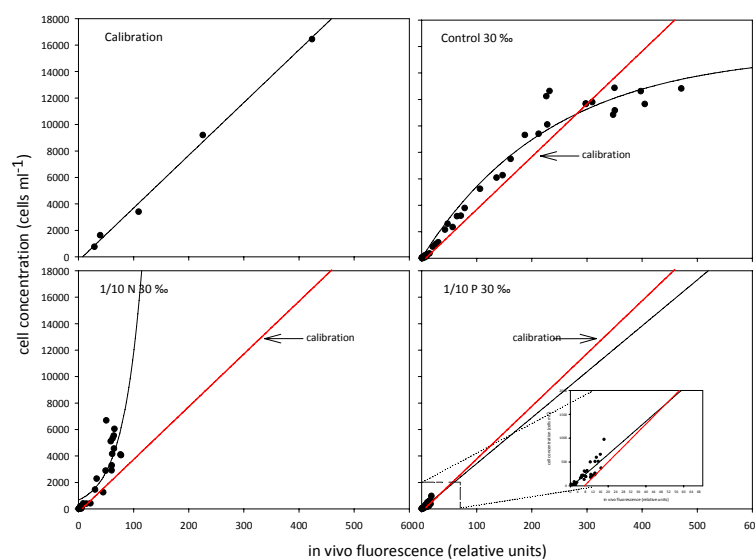


Figure 10: Relationship between cell concentration and *in vivo* fluorescence under varying nutrient limitations and salinities.

Comparison of results received by cell counting with Sedgewick Rafter's counting chamber and results obtained by calculation of cell concentrations using *in vivo* fluorescence showed that calculation using the fluorimeter would generally lead to underestimation of cells during the exponential growth phase for media containing sufficient nutrients. In addition, calculation of the cell density in N-limited media would lead to underestimation at the end of the growth period. Therefore, a measurement of *in vivo* fluorescence of *P. reticulatum* cultures was not applicable to determine absolute cell concentrations. In conclusion we decided to determine growth curves by manual counts using Sedgewick Rafter chambers.

#### 4.2. Influence of nutrients and temperature on growth and YTX concentration

*P. reticulatum*, isolated from the North Sea displays a growth optimum at 15 °C under nutrient sufficient conditions (Fig. 2a). In contrast, at higher temperature (in this case 20 °C) growth decreased considerably (Fig. 2b). Hence, a *P. reticulatum* bloom with high cell densities is more likely to occur during the spring or early summer months.

Dinoflagellates are capable of storing N and P in intracellular pools for use during times of deficiency (Cembella et al., 1984, Dortch et al., 1984). The low chlorophyll *a* concentration (Fig. 4), which was detectable in all N-deficient cultures, indicated that those cells were indeed N deficient (Boyer et al., 1987). Beside temperature and nutrient-availability salinity is a factor influencing the growth of *P. reticulatum*, which is known to grow in a wide range of salinities (Guerrini et al., 2007, Koike et al., 2006). In our experiments the growth of *P. reticulatum* decreased with lower salinity and is next to zero at salinities underneath 15 ‰ salinity. Therefore, a bloom waters with low salinities is unlikely.

Eutrophication adherent with alteration of the composition of nutrients could enhance the chances for accelerated growth of harmful algal bloom (HAB) species (Anderson et al., 2002). In this context, rising anthropogenic effects together with simultaneous climate change have been reported worldwide and also in the North Sea (Edwards et al., 2006, Wiltshire et al., 2008). N and P are important nutrients for the growth of microalgae, where upon microalgae are known to require N in a higher quantity compared to P. N is mostly limiting factor with regard to phytoplankton growth in marine and estuary waters albeit P can also be the limiting factor under large N input (Anderson et al., 2002). Therefore, changes of nutrient composition or temperature of the North Sea during the seasons lead to characteristic differences in growth of the phytoplankton species within HABs. However,

increasing temperature of the water of the North Sea caused by climate change would not lead to a higher risk for a bloom of *P. reticulatum*. In the North Sea phosphorous (P) seems to be the first limiting nutrient in spring and nitrogen (N) in summertime (Peeters et al., 1991). A higher input of nutrients during the spring caused by eutrophication could result in increased phytoplankton growth and a possible P-limitation at the end of the bloom stopping cell division can cause very high YTX concentrations cell<sup>-1</sup>.

#### 4.2.1. YTX concentration in *P. reticulatum* cells

From our experiments it is evident that for *P. reticulatum* a clear correlation between the total concentration of YTXs and nutrient limitation can be observed (Fig. 5). Whereas the cell quota of YTX generally increased in the following order: N-limitation < control < P-limitation. Unfavourable growth conditions can induce changes of cell size, morphology and earlier entrance into the stationary growth phase. This effect can correlate with the formation of temporary resting stages (hypnocygotes) and such cells were found in the control media (at lower salinities, Fig. 11c) and in P-limited media (Figs 12c and d), whereby the occurrence was partly correlated with an increased production of YTXs.

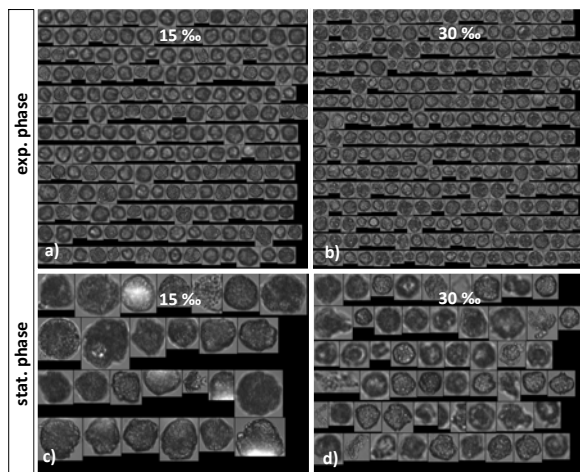


Figure 11: Influence of salinity and growth phase on cell size and morphology of *P. reticulatum* cultured in f/2-media without silica at 15 °C, nutrient sufficient media (C); Pictures made by Flow CAM; a) exp. growth phase (GP), Salinity (S)=15 ‰ salinity, b) exp. GP, S=30 ‰ salinity, c) stat. GP, S=30 ‰ salinity, d) stat. GP, S=30 ‰ salinity

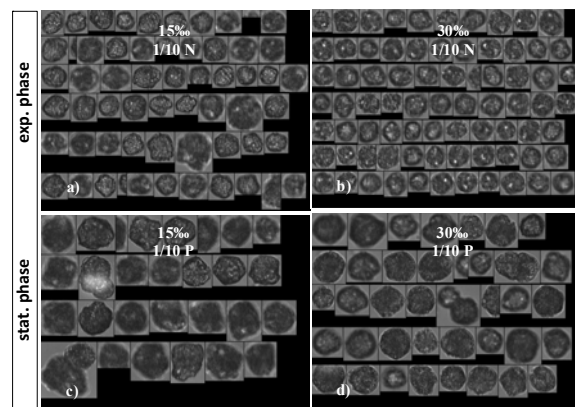


Figure 12: Influence of salinity and growth phase on cell size and morphology of *P. reticulatum* cultured in f/2-media without silica at 15 °C, nitrogen-limited (1/10 N) and phosphorous-limited (1/10 P) at the lowest (15 ‰) and highest (30 ‰) salinity; Pictures made by Flow CAM; a) 1/10 N, stat. GP, S = 15 ‰ salinity, b) 1/10N, stat. GP, S=30 ‰ salinity, c) 1/10 P, stat. GP, S = 15 ‰ salinity, d) 1/10P, stat. GP, S=30 ‰ salinity

A deformation of cells was noticeable at higher temperatures, especially in the control media at higher salinities (Fig. 13).

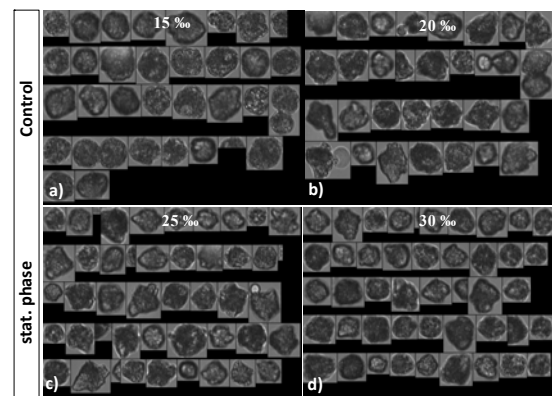


Figure 13: Influence of salinity and growth phase on cell size and morphology of *P. reticulatum* cultured in f/2-media without silica at 15 °C, nitrogen-limited (1/10 N) and phosphorous-limited (1/10 P) at the lowest (15 ‰) and highest (30 ‰) salinity; Pictures made by Flow CAM; a) 1/10 N, stat. GP, S = 15 ‰ salinity, b) 1/10N, stat. GP, S=30 ‰ salinity, c) 1/10 P, stat. GP, S = 15 ‰ salinity, d) 1/10P, stat. GP, S=30 ‰ salinity

Recently, it was reported that the YTX concentration increased with increasing salinity (Guerrini et al., 2007). After normalization of the YTX cell quota to the cell size, this YTX profile was not observed during the exponential growth phase but it was found during the stationary phase (Fig. 14). Generally, cell quotas of YTXs cultured at higher temperature increased with increasing salinity during the stationary phase, whereby the influence of limitations was not obvious (Fig. 15).

Possibly higher temperatures inhibited the toxin production which is not in agreement with observations by Guerrini et al. (2007) and Paz et al. (2006). But the conditions of the cultures were not optimal at 20 °C and therefore, we suppose that YTX production is associated to a functioning metabolism (Fig. 13). Especially in P-limited cells at 15 °C a longer cultivation time caused higher YTX cell quota, which was also observed when the size was included (Figs 2, 14). Because P-limitation is known to stop the cell division in other dinoflagellates without die back of the cells, an accumulation of YTX under ongoing metabolism is likely, since it is established for other species that P-limitation can cause accumulation of several fatty acids and those are known to have a similar precursor as polyketides.

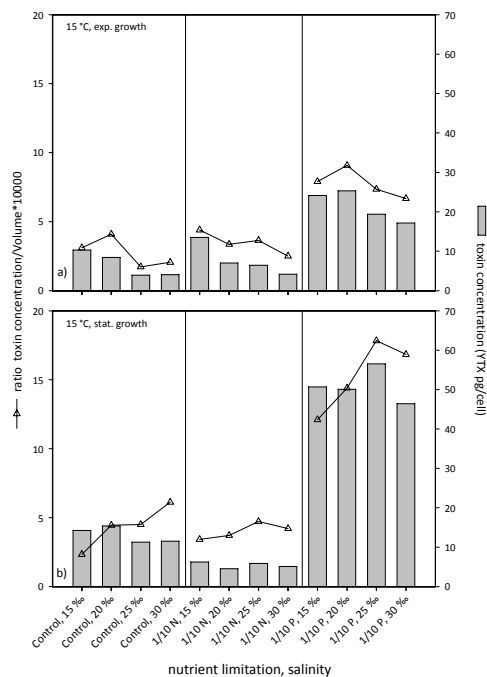


Figure 14: Comparison of YTX concentration (pg/cell) and ratio of YTX concentration to volume, depending on nutrient limitation and salinity, for *P. reticulatum* cultured at 15°C in: a) the exponential growth phase and b) the stationary phase.

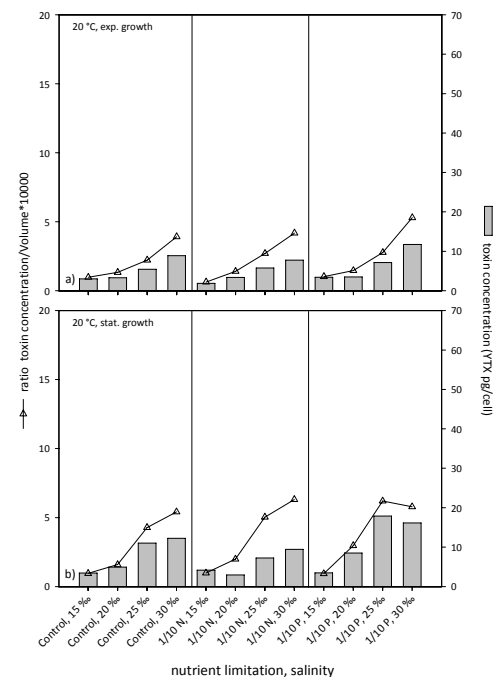


Figure 15: Comparison of YTX concentration (pg/cell) and ratio of YTX concentration to volume, depending on nutrient limitation and salinity, for *P. reticulatum* cultured at 20°C in: a) the exponential growth phase and b) the stationary phase.

specific environmental conditions as changes of the salinity or nutrient limitation can lead to an altered toxin production or altered toxin patterns in dinoflagellates (Anderson et al., 1990, Beani et al., 2000, Boyer et al., 1987, Grzebyk et al., 2003, Maier Brown et al., 2006, Roeder et al. 2009). Hence, the formation of Brevetoxins (PbTx) was investigated under various salinities and the data revealed that the influence of such parameters is very complex and it was evident that PbTx concentrations were always higher in the stationary phase (Maier Brown et al., 2006). The production of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins (e.g. by *Alexandrium* spp.) is higher at low phosphorus concentrations (Anderson et al., 1990, Beani et al., 2000, Boyer et al., 1987, Grzebyk et al., 2003) and low salinity values (Hwang & Lu, 2000) whereas N-limitation can cause a decrease of toxin concentration (Boyer et al., 1987). The same effect on toxicity caused by lower salinity was reported in a work about toxin production of the raphidophycean flagellate *Heterosigma akashiwo* (Haque & Onoue, 2002). Those examples are in large part consistent with our experiment and illustrate the need for the elucidation of a

potential risk for toxic dinoflagellate events in the North Sea and other marine environments.

It is still unknown why polyether toxins are produced by several dinoflagellate species and the question remains why in one strain nutrient limitation leads to an increased toxin quota per cell but not in the other. Hence, more investigations are needed to discover the dynamics and mechanisms concerning toxin formation in marine dinoflagellates during HABs.

#### **4.2.2. Extracellular YTX concentration**

In several studies it was found that YTX was released into the medium and several reasons have been suggested (Mitrovic et al., 2005, Paz et al., 2004, 2006 and 2007). Data published by Paz et al. (2004, 2006 and 2007) showed that the total toxin amount of YTX in some cultures reaches a considerable amount up to 38 % of total YTX concentrations. During our experiments YTX was detected in the filtrate in low concentrations during the exponential growth period. It was evident, that the measured YTX found in the culture media increased significantly during the stationary phase. Obviously, the release of YTX in the media depends on the salinity and on nutrient availability. Guerrini et al. (2007) found that the release of YTX into the culture media seems to be higher under N-limitation, which was observable in our N-limited cultures at 15 °C.

We suppose that the detected YTX in the filtrate is caused by leakage from disintegrated cells. This hypothesis is supported by increasing YTX concentrations in the stationary phase and by the higher concentrations in cultures with unfavourable conditions. The percentage of intracellular to extracellular YTX in P-limited cultures did not change during culturing. Therefore, it is evident that less YTX was released into the medium in P-limited cultures. Furthermore, P-limited cells cultured at 15 °C contained a high cell quota of YTX in the late stationary phase caused by the putative entrance into a “temporary resting stage”. In addition the assumption that lower YTX concentrations in the filtrates are caused by less disintegrated cells, supports the theory that resting stages were formed and that the high YTX cell quotas could be a product of ongoing metabolism in those P-limited cells of *P. reticulatum* (see 4.2.1., Figs 5 and 9, Tab. 4).

Table 4: Percentage of YTX (%) in cells of *P. reticulatum* and in the media filtrate in the exponential and the stationary phase.

percentage (%) of YTX cell quota in the filtrate and							
YTX cell quota in cells of <i>P. reticulatum</i>							
		C		1/10 N		1/10 P	
temp. (°C)	salinity (‰)	filtrate	cells	filtrate	cells	filtrate	cells
15	exp. phase						
	15	8	92				
	20	7	93				
	25	4	96				
	30	7	93	4	96	3	97
	stat. phase						
	15	25	75				
	20	24	76				
	25	19	81				
	30	13	87	43	57	4	96
20	exp. phase						
	15	10	90				
	20	10	90				
	25	2	98				
	30	3	97	3	97	3	97
	stat. phase						
	15	24	76				
	20	33	67				
	25	20	80				
	30	7	93	12	88	16	84

## 5. Conclusion

The strain of *P. reticulatum* under investigation during this study showed a good growth at salinities in the range of 20-30 ‰ salinity, with strong influence of water temperature and of nutrient limitation on the formation of YTXs. Generally, N-limited cultures displayed the lowest and P-limited cultures the highest YTX cell quota. Moreover, it was possible to connect the different cell phases with morphological characteristics and resting stages of the cell. In fact a higher volume of the cell was monitored at lower salinities accompanied by an increase of YTX concentration. Summarizing it can be stated that the higher risk for toxic *P. reticulatum* blooms in the North Sea exists during a bloom in spring with P-limitation at the end of the bloom.

## References

- AASEN, J., SAMDAL, I., MILES, C.O., DAHL, E., BRIGGS, L. & AUNE, T. (2005). Yessotoxins in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon*, **45**: 265-272.
- ANDERSON, D.M., KULIS, D.M., SULLIVAN, J.J., HALL, S. & LEE, C. (1990). Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp.. *Mar. Biol.*, **104**: 511-524.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M. & Burkholder, J.M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, **25**: 704-726.
- BEANI, L., BIANCHI, C., GUERRINI, F., MARANI, L., PISTOCCHI, R., TOMASINI, M.C., CEREDI, A., MILANDRI, A., POLETTI, R. & BONI, L. (2000). High sensitivity bioassay of paralytic (PSP) and amnesic (ASP) algal toxins based on the fluorimetric detection of  $[Ca^{2+}]_i$  in rat cortical primary cultures. *Toxicon*, **38**: 1283-1297.



- BOYER, G.L., SULLIVAN, J.J., ANDERSEN, R.J., HARRISON, P.J. & TAYLOR F.J.R. (1987). Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarens*. *Mar. Biol.*, **96**: 123-128.
- CSEMBELLA, A.D., ANTIA, N.J. & HARRISON P.J. (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: Part 1. *Crit. Rev. Microbiol.*, **10**: 317–391
- CIMINIELLO, P., FATTORUSSO, E., FORINO, M., POLETTI, R., SATAKE, M., VIVIANI, R. & YASUMOTO, T. (1997). Yessotoxin in mussels of the northern Adriatic Sea. *Toxicon*, **35**: 177-183.
- CIMINIELLO, P., DELL’AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., FORINO, M., MAGNO, S., GUERRINI, F., PISTOCCHI, R. & BONI, L. (2003). Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic Sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicon*, **42**: 7-14.
- DORTCH, Q., CLAYTON, J.R., THORESEN, S.S. & AHMED, S.I. (1984). Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol.*, **81**: 237-250.
- DRAISCI, R., FERRETTI, E., PALLESCHI, L., MARCHIAFAVA, C., POLETTI, R., MILANDRI, A., CEREDI, A. & POMPEI, M. (1999). High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon*, **37**: 1187-1193.
- EDWARDS, M., JOHNS, D.G., LETERME, S.C., SVENDSEN, E. & RICHARDSON, A.J. (2006). Regional climate change and harmful algal blooms in the northeast Atlantic. *Limnol. Oceanogr.*, **51**: 820-829.
- EIKI, K., SATAKE, M., KOIKE, K., OGATA, T., MITSUYA, T. & OSHIMA, Y. (2005). Confirmation of yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in Mutsu Bay. *Fish. Science*, **72**: 633-638.
- FINCH, S.C., WILKINS, A.L., HAWKES, A.D., DWAYNE, J.J., MACKENZIE, A.L., BEUZENBERG, V., QUILLIAM, M.A., OLSEN, C.D., SAMDAL, I.A., AASEN, J., SELWOOD, A.I., COONEY, J.M. SANDVIK, M. & MILES, C.O. (2005). Isolation and identification of (44-R,S)-44,55-dihydroxyessotoxin from *Protoceratium reticulatum*, and its occurrence in extracts of shellfish from New Zealand, Norway and Canada. *Toxicon*, **46**: 160-170.
- GALLARDO RODRÍGUEZ, J.J., SÁNCHEZ MIRON, A., DEL CARMEN CERON GARCIA, M., HASSAN BELARBI, H., GARCÍA CAMACHO, F., CHISTI, Y. & MOLINA GRIMA, E., (2009). Macronutrients requirements of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*, **8**: 239-246.
- GRZEBYK, D., BÉCHEMIN, C., WARD, C.J., VÉRITÉ, C., CODD, G.A. & MAESTRINI, S.Y. (2003). Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *J. Plankt. Res.*, **25**: 1185-1199.
- GUERRINI, F., CIMINIELLO, P., DELL’AVERSANO, C., TARTAGLIONE, L., FATTORUSSO, E., BONI, L. & PISTOCCHI, R. (2007). Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in batch-cultures. *Harmful Algae*, **6**: 707-717.
- GUILLARD, R.R. (1973). Division rates. In *Handbook of phycological methods - Culture methods and growth measurements* (Stein, J.R., editor), 289-311, Cambridge University Press, London.
- GUILLARD, R.R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of marine invertebrate animals*, (W.L. Smith & Chanley, M.H., editors). Plenum Press: New York: 29–60.

- HAQUE, S.M. & ONOUE, Y. (2002). Effects of salinity on growth and toxin production of a noxious phytoflagellate, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Botanica Marina*, **45**: 356-363.
- HOPPENRATH, M. (2004). A revised checklist of planktonic diatoms and dinoflagellates from Helgoland (North Sea, German Bight). *Helgol. Mar. Res.*, **58**: 243-251.
- HOPPENRATH, M., ELBRÄCHTER, M. & DREBES, G. (2009) Marine Phytoplankton. Selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. Kleine Senckenberg-Reihe 49, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele & Obermiller), Stuttgart, 264 pp.
- HOWARD, M.D.A., SILVER, M., & KUDELA, R.M. (2008). Yessotoxin detected in mussel (*Mytilus californicus*) and phytoplankton samples from the U.S. west coast. *Harmful Algae*, **7**: 646-652.
- HWANG, D.F. & LU, Y.H. (2000). Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon*, **38**: 1491-1503.
- KOIKE, K., HORIE, Y., SUZUKI, T., KOBIYAMA, A., KURIHARA, K., TAKAGI, K., KAKA, S.-N. & OSHIMA, Y. (2006). *Protoceratium reticulatum* in northern Japan: environmental factors associated with seasonal occurrence and related contamination of yessotoxin in scallops. *J. Plankt. Res.*, **28**: 103-112.
- KROCK, B., ALPERMANN, T., TILLMANN, U., PITCHER, G.C. & CEMBELLA, A.D. (2006). Yessotoxin (YTX) profiles from cultures and plankton samples of the marine dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Gonyaulax spinifera*. Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, 4-8 September 2006 / Editor-in Chief, Øjvind Moestrup. Copenhagen: International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA) and the Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC of UNESCO), 303-305.
- KROCK, B., SEGUEL, C.G., VALDERRAMA, K. & TILLMANN, U. (2009). Pectenotoxins and yessotoxin from Arica Bay, North Chile as determined by tandem mass spectrometry. *Toxicon*, **54**: 364-367.
- LIM, P.-T. & OGATA, T., (2005). Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Toxicon*, **45**: 699-710.
- MACKENZIE, L., TRUMANN, P. & YASUMOTO, T. (1998). Dinoflagellate blooms and associated DSP-toxicity in shellfish in New Zealand. In Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (eds), *Harmful Algae*. Xunda de Galacia, Spain and Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco, Paris: 74-77.
- MAIER BROWN, A. F., DORTCH, Q., VAN DOLAH, F.M., LEIGHFIELD, T.A., MORRISON, W. THESSEN, A.E., STEIDINGER, K., RICHARDSON, B., MONCREIFF, C.A. & PENNOCK, J.R. (2006). Effect of salinity on the distribution, growth, and toxicity of *Karenia* spp.. *Harmful Algae*, **5**: 199-212.
- MILES, C.O., WILKINS, A.L., JENSEN, D.J., COONEY, J.M., QUILLIAM, M.A., AASEN, J. & MACKENZIE, A.L. (2004). Isolation of 41a-Homoyessotoxin and the Identification of 9-Methyl-41ahomoyessotoxin and Nor-ring A-yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. *Chem. Res. Toxicol.*, **17**: 1414-1422.
- MILES, C.O., SAMDAL, I.A., AASEN, J.A.G., JENSEN, D.J., QUILLIAM, M.A., PETERSEN, D., BRIGGS, L.M., WILKINS, A.L., RISE, F., COONEY, J.M. & MACKENZIE, J.A. (2005a). Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*, **4**: 1075-1091.

- MILES, C.O., WILKINS, A.L., HAWKES, A.D., SELWOOLD, A.I., JENEN, D.J., MUNDAY, R., COONEY, J.M. & BEUZENBERG, V. (2005b). Polyhydroxylated amide analogs of yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, **45**: 61–71.
- MILES, C.O., WILKINS, A.L., HAWKES, A.D., SELWOOD, A.I., JENSEN, D.J., COONEY, J.M., BEUZEBERG, V. & MACKENZIE, A.L. (2006a). Identification of 45-hydroxy-46,47-dinoryessotoxin, 44-oxo-45,46,47-trinoryessotoxin, and 9-methyl-42,43,44,45,46,47,55-heptanor-38-en-41-oxoyessotoxin, and partial characterization of some minor yessotoxins, from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, **47**: 229-240.
- MILES, C.O., WILKINS, A.L., SELWOOD, A.I., HAWKES, A.D., JENSEN, D.J., COONEY, J.M., BEUZENBERG, V. & MACKENZIE, A.L. (2006b). Isolation of Yessotoxin 32-O-[ $\beta$ -L-arabinofuranosyl-(5'  $\rightarrow$  1'')- $\beta$ -L-arabinofuranoside] from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, **47**: 510-516.
- MITROVIC, S.M. , FERNÁNDEZ AMANDI, M., MCKENZIE, L., FUREY, A. & JAMES, K.J. (2004). Effects of selenium, iron and cobalt addition to growth and yessotoxin production of the toxic marine dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **313**: 337-351.
- MITROVIC, S.M., HAMILTON, B., MACKENZIE, L. & FUREY, A., JAMES, K.J. (2005). Persistence of yessotoxin under light and dark conditions. *Mar. Environm. Res.*, **60**: 397-401.
- MURATA, M., KUMAKAI, M., SOO LEE, J. & YASUMOTO, T. (1987). Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedr. Lett.*, **28**: 5869-5872.
- PARKHILL, J.-P. & CEMBELLA, A.D. (1999). Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. *J. Plankt. Res.*, **21**: 939-955.
- PAZ, B., RIOBÓ, P., FERNÁNDEZ, M.L., FRAGA, S. & FRANCO, J.M. (2004). Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon*, **44**: 251-258.
- PAZ, B., RIOBÓ, P., SOUTO, M.L., GIL, L.V., NORTE, M., FERNANDEZ, J.J. & FRANCO, J.M. (2006). Detection and identification of glycoyessotoxin A in a culture of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, **48**: 611-619.
- PAZ, B., RIOBÓ, P., FERNÁNDEZ, M.L., FRAGA, S., FRANCO, J.M., RAMILO, I. & FRANCO, J.M. (2007). Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon*, **50**: 1-17.
- PAZ, B., DARANAS, A.H., NORTE, M., RIOBÓ, P., FRANCO, J.M. & FERNÁNDEZ, J.J. (2008). Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: An overview. *Marine Drugs*, **6**: 73-102.
- PEETERS, J.V.H., HAAS, H.A., PEPERZAK, L. & WEITSTEYN, L.P.M.J. (1991). Limiting factors for phytoplankton in the North Sea. *Wat. Sci. Tech.*, **24**: 261-267.
- RAMSTAD, H., HOVGGAARD, P., YASUMOTO, T., LARSEN, S. & AUNE, T. (2001). Monthly variations in diarrhetic toxins and yessotoxin in shellfish from coast to the inner part of the Sognefjord, Norway. *Toxicon*, **39**: 1035-1043.
- RHODES, L., McNABB, P., DE SALAS, M., BRIGGS, V., BEUZENBERG, V. & GLADSTONE, M. (2006). Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae*, **5**: 148-155.
- RICCARDI, M., GUERRINI, F., RONCARATI, F., MILANDRI, A., GANGINI, M., RIGOZZI, S., RICCARDI, E., CEREDI, A., CIMINIELLO, P., DELL' AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., FORINO, M., TARTAGLIONE, L. & PISTOCCHI, R.

- (2009). *Gonyaulax spinifera* from the Adriatic Sea: Toxin production and phylogenetic analysis. *Harmful Algae*, **8**: 279-290.
- ROEDER, K., ERLER, K., KIBLER, S., TESTER, P., VAN THE, H., NGUYEN-NGOC, L., GERDTS, G. & LUCKAS, B. (2009). Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp.. *Toxicon*, **xxx**: 1-8.
- SAMDAL, I.A., NAUSTVOLL, L.J., OLSENG, C.D., BRIGGS, L.R. & MILES, C.O. (2004). Use of ELISA to identify *Protoceratium reticulatum* as a source of yessotoxin in Norway. *Toxicon*, **44**: 75-82.
- SATAKE, M., TERAWAWA, K., KADOWAKI, Y. & YASUMOTO, T. (1996). Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogues from toxic scallops. *Tetrahedr. Lett.*, **37**: 5955-5958.
- SATAKE, M., MACKENZIE, L. & YASUMOTO, T. (1997). Identification of *Protoceratium reticulatum* as biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Tox.*, **5**: 164-167.
- SATAKE, M., ICHIMURA, T., SEKIGUCHI, K., YOSHIMATSU, S. & OSHIMA, Y. (1999). Confirmation of yessotoxin and 45, 46, 47-trinoryessotoxin production by *Protoceratium reticulatum* in Japan. *Nat. Tox.*, **7**: 147-150.
- SATAKE, M., EIKI, M., ICHIMURA, T., OTA, S., SEKIGUCHI, K. & OSHIMA, Y. (2006). Structure of 45, 46, 47-trinorhomoyessotoxin, a new analog, from *Protoceratium reticulatum* which represents the first detection of a homoyessotoxin analog in Japan. *Harmful Algae*, **5**: 731-735.
- SIERACKI, C.K., SIERACKI, M.E., YENTSCH, C.S. (1998). An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **168**: 285-296.
- SUZUKI, T., HORIE, Y., KOIKE, K., SATAKE, M., OSHIMA, Y., IWATAKI, M. & SADAOKI, Y. (2007). Yessotoxin analogues in several strains of *Protoceratium reticulatum* in Japan determined by liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry. *J. Chrom. A*, **1142**: 172-177.
- TUBARO, A., SIDARI, L., DELLA LOGGIA, R. & YASUMOTO, T. (1998). Occurrence of homoyessotoxin in phytoplankton and mussels from Northern Adriatic Sea. In *Harmful Algae* (Reguera, B. Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T., editors), 470-472, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Grafisant, Santiago de Compostela.
- WILTSHIRE, K.H., MALZAHN, A.M., GREVE, W., WIRTZ, K., JANISCH, S., MANGELSDORF, P., MANLY, B. & BOERSMA, M. (2008). Resilience of North Sea phytoplankton spring bloom dynamics: An analysis of long-term data at Helgoland Roads. *Limnology and Oceanography*, **53**: 1294-1302.
- YASUMOTO, T. & TAKIZAWA, A. (1997). Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**: 1775-1777.

## 5 Manuskript III

### **Influence of phosphorus concentration on the yessotoxin formation of different strains of *Protoceratium reticulatum***

#### **Autoren**

Karin Röder<sup>1</sup>, Gunnar Gerdt<sup>2</sup>, Kazuhiko Koike<sup>3</sup>, Allan Cembella<sup>4</sup>, Bernd Krock<sup>4</sup>, Bernd Luckas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, LS Lebensmittelchemie, Dornburger Straße 25, 07743 Jena, Deutschland

<sup>2</sup> Biologische Anstalt Helgoland, Alfred-Wegener-Institute für Polar- und Meeresforschung, POB 180, 27498 Helgoland, Deutschland

<sup>3</sup> Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8523, Japan

<sup>4</sup> Alfred-Wegener-Institute für Polar- und Meeresforschung, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Deutschland

#### **Korrespondierender Autor:**

Karin Roeder

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, LS Lebensmittelchemie, Dornburger Straße 25, 07743 Jena, Deutschland

Tel.: +49 3641 949 653, Fax: +49 3641 949 652

E-mail address: [Karin.Roeder@uni-jena.de](mailto:Karin.Roeder@uni-jena.de)

**Abstract**

*Protoceratium reticulatum* as a producer of yessotoxin (YTX) and its analogues is common in several coastal environments. Little is known about the ecological factors, influencing the toxin production of this dinoflagellate species. In a previously published study (Röder et al., XXXX) we showed that P-limitation caused high YTX cell quotas in a *P. reticulatum* isolate from the German Bight (North Sea). Because this finding was in contrast to other publications, the *P. reticulatum* strain from the German Bight and further YTX-producing strains of *P. reticulatum* from Japan, the Pacific and the Atlantic Ocean were analysed to study the influence of P-limitation on YTX formation in more detail (N/P ratio: 12.18, 24.36, 48.73 and 121.82). YTX and its analogues were analysed by high pressure liquid chromatography (LC) with tandem mass spectrometry (MS/MS). In addition cell size and morphology were analysed by Flow CAM.

We were able to show, that the YTX formation strongly depends on growth phase and the physical condition of the respective culture. In general, cultures exhibited the highest YTX cell quota at the end of the stationary phase. The strong effect of P-limitation on YTX cell quotas which was reported previously was observed in cultures generally growing under good conditions. Therefore, we assume that the higher YTX cell quota correlates with an ongoing metabolism in cells with low cell division rates (e.g. hypnocygotes).

Keywords: YTX; carboxy yessotoxin; keto yessotoxin; formation in dependency on phosphorous; *Protoceratium reticulatum*; *Gonyaulax grindleyi*; LC-MS/MS analyses, Flow Cam

## 1. Introduction

Yessotoxin (YTX), a disulphated polyether toxin, was first isolated by Murata et al. (1987) from digestive glands of Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*). Up to now about 100 YTX analogues (YTXs) were isolated from microalgae, phytoplankton and molluscs but only 40 % are characterized concerning their exact chemical structure (Paz et al., 2008).

Three species of dinoflagellates were identified as YTXs producers, these are *Protoceratium reticulatum* (Claparède & Lachmann) Bütschli (syn.: *Gonyaulax grindleyi*) (Satake et al., 1997), *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge (syn.: *Gonyaulax polyedra*) (Tubaro et al., 1998, Draisci et al., 1999) and *Gonyaulax spinifera* (Claparede & Lachmann) Diesing (Rhodes et al., 2006, Riccardi et al., 2009). Meanwhile, the production of YTX by the dinoflagellate *P. reticulatum* has been reported in New Zealand, Japan, Norway, UK, Canada, USA, Spain, Italy, and Africa (Ciminiello et al., 2003, Finch et al., 2005, Krock et al., 2006, Paz et al., 2004, 2006, 2007, Ramstad et al., 2001, Samdal et al., 2004, Satake et al., 1997, 1999, 2006).

The YTX cell quota of *P. reticulatum* ranged from 0.9 to 79 pg YTX cell<sup>-1</sup> (Eiki et al., 2005, Howard et al., 2008, MacKenzie et al., 2002, Mitrovic et al., 2005, Paz et al., 2004 and 2007, Samdal et al., 2004, Satake et al., 1996 and 1999). Whereby, the concentration of YTX in *L. polyedrum* is up to 1.5 pg YTX cell<sup>-1</sup> and in *G. spinifera* up to 200 pg YTX cell<sup>-1</sup> (Draisci et al., 1999, Howard et al., 2008, Paz et al., 2004, Ramstad et al., 2001, Rhodes et al., 2006, Tubaro et al., 1998).

Although the major toxin of *P. reticulatum* is YTX, some strains contained homo YTX as prominent analogue (Paz et al., 2008). Suzuki et al. (2007) reported about *P. reticulatum* strains, isolated at different sites of Japanese coasts (e.g. Mutsu Bay and Okirai Bay), which besides YTX also produce 45,46,47-trinor YTX, 1-homo YTX, 45,46,47-trinor-1-homo YTX and less frequent times 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxo YTX (noroxoYTX enone; ketoYTX). Some of the strains contained more than 50 % YTX analogues of the total YTXs concentration (Suzuki et al., 2007). Adriatoxin (ATX), an YTX-like toxin, was isolated from mussels from the Adriatic Sea. The structure of ATX is similar to YTX for ring A to ring J but in contrast to YTX the 11'th ether-ring (ring K) is absent in ATX. In addition, ATX contains a hydroxyl-group at C-36 and a third sulphate-group at C-37 at ring J (Ciminiello et al., 1998). Because ATX was not detected in phytoplankton samples, it was assumed that ATX is produced by metabolic degradation in shellfish tissue. Currently, a *P. reticulatum* strain was identified as ATX B-producer indicating that the dinoflagellates could be the source of ATX and similar

compounds (Dominguez et al., 2010). The structure of ATX B is similar to ATX but the third sulphate group at C-37 is replaced by a methyl-group.

Environmental conditions are important for the production of toxins by dinoflagellates. For example the production of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins (e.g. by *Alexandrium* spp.) is higher at low phosphorus concentrations and low salinity values (Anderson et al., 1990, Beani et al., 2000, Hwang & Lu, 2000).

Up to now only few studies addressed the question how environmental factors influence the YTX production of *P. reticulatum*. Gallardo Rodríguez et al. (2009) and Guerrini et al. (2007) reported about macronutrient requirements; the influence of micronutrients was investigated by Mitrovic et al. (2004). Among the published studies concerning the effect of nutrients on growth and toxin production, some are also addressing the influence of temperature and salinity (Guerrini et al., 2007). Recently it was showed that *P. reticulatum* isolated from the German Bight (North Sea) displayed at optimal temperature under P-limitation a very high YTXs cell quota (Roeder et al., submitted). It is still unknown why polyether toxins are produced by several dinoflagellate species and the question remains why in one strain nutrient limitation leads to an increased toxin quota per cell but not in the other (Guerrini et al., 2007, Paz et al, 2006, Roeder et al., submitted). Hence the aim of the study was to investigate if P-limitation can lead to an increase of toxin production in other *P. reticulatum* isolates. Therefore, beside this recently investigated strain, three strains from different geographical areas were selected to study the influence of P-limitation on YTX formation in more detail.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Media preparation, culture conditions, sampling and determination of the cell growth

Four strains were selected to investigate the influence of P-limitation, the strain from the German Bight (North Sea) (Hoppenrath, 2004, Hoppenrath et al., 2009) and YTX-producing strains of *P. reticulatum* from Japan (030717-YB-PR1), the Pacific Ocean, USA (CCMP 1889) and the Atlantic Ocean, USA (CCMP 1720) (Tab. 1).



Table 1: Origin of the *P. reticulatum* strains under investigation

Strain Denotation <i>P. reticulatum</i>	Country	Origin
German Bight (North Sea)	Germany	North Sea
CCMP 1720	USA	Biscayne Bay, Miami, Florida
	USA	
CCMP 1889		Friday Harbour, San Juan Island, Washington
030717-YB-PR-1	Japan	Yamada Bay, Iwate pref

All strains were maintained in 500 ml borosilicate Erlenmeyer flasks in L1-media without silicate (Guillard and Hargraves, 1993) at  $70\text{--}90\ \mu\text{mol sec}^{-1}\ \text{m}^{-2}$ ,  $18\ ^\circ\text{C}$  and a 12:12 h light/dark regime in 30 ‰ salinity natural seawater. L1-media and a temperature of  $18\ ^\circ\text{C}$  were suitable for most of the cultures. Those conditions were selected for the experimental setup even if previous experiments indicated that *P. reticulatum* (German Bight) found best growth conditions at  $15\ ^\circ\text{C}$  in f/2-media, because the primary intention of this study was to identify the growth and toxin formation under P-limitation of other toxic strains.

The influence of the P-concentration on the growth and the YTX production was estimated at four N/P-ratios. Natural seawater of the North Sea with salinity of 30 ‰ was used as basis for L1-media. For nutrient treatments L1-media were enriched with twofold the amount of phosphorus (2P), half the amount of P (1/2 P) and five times less of the amount of P (1/5 P) compared to the original concentration of P in L1 (Tab. 2). L1 served as control (C) containing the original concentration of nutrients (Tab. 2).

Table 2: Nutrient concentration in the final media

Component	Molar Concentration in Final Media			
	Control	2 P	1/2 P	1/5 P
$\text{NO}_3^-$	$8.82 \times 10^{-4}\ \text{M}$	$8.82 \times 10^{-4}\ \text{M}$	$8.82 \times 10^{-4}\ \text{M}$	$8.82 \times 10^{-4}\ \text{M}$
$\text{PO}_4^{3-}$	$3.62 \times 10^{-5}\ \text{M}$	$7.24 \times 10^{-5}\ \text{M}$	$1.81 \times 10^{-5}\ \text{M}$	$0.724 \times 10^{-5}\ \text{M}$
N/P	24.36	12.18	48.73	121.82

The pH-value was adjusted to  $7.6 \pm 0.02$  using HCl and the different media were incubated at  $18\ ^\circ\text{C}$ . Five replicates of each treatment were incubated in Erlenmeyer flask's (1 litre). The flasks were inoculated with mid exponential stock cultures of *P. reticulatum*. The strain from Japan (030717-YB-PR1), the German Bight and from the Pacific Ocean (CCMP 1889) contained  $10\ \text{cells ml}^{-1}$  on inoculation, respectively and the strain from the Atlantic Ocean (CCMP 1720) contained  $5\ \text{cells ml}^{-1}$  on inoculation.

The growth curve was determined by cell counting of *P. reticulatum* in 4 to 6-day intervals. To get more information about the production of YTXs in the different growth phases it was decided to sample at day 9, 14, 21, and 26. Cells were enumerated using Sedgwick rafter's

counting chamber under light microscope (10 x magnification), minimum 400 cells were counted.

For determination of cell size and morphology, subsamples of 50 ml were analysed using the Flow CAM (Fluid Imaging Technologies, USA, further details see Sieracki et al., 1998). For most of the samples, a minimum of 400 cells were measured with a 20 x objective and a flow cell of 100  $\mu\text{m}$  in depth. The diameter, volume, length and width of each measured cell were recorded.

## **2.2. Extraction of yessotoxins and measurement by LC–MS/MS**

For extraction of YTXs 100 ml of the cultures were filtered on GF/C filter (Whatman, GB) under slight vacuum, respectively. Filters were extracted according to the method by Roeder et al. (submitted). Certified YTX standard solution, dissolved in MeOH, was obtained from the National Research Council (NRC) Canada (Halifax, Canada). The LC-MS/MS measurement was carried out using a modified method of Krock et al. (2006).

HPLC was carried out with Agilent 1100 System containing a binary pump, an autosampler with thermostat, and a column oven. The autosampler temperature was set to 6 °C and the column oven temperature to 20 °C, respectively. Liquid chromatography was performed using Luna C8 column (5  $\mu\text{m}$ , Å, 50 x 2.0 mm) with security guard (Phenomenex, Germany) by gradient elution at a flow of 0.3 ml min<sup>-1</sup>. The injection volume was 5  $\mu\text{l}$ . Mobile phase consists of eluent A: 5 mM ammonium formate in acetonitrile/water (10:90) and of eluent B: 5 mM ammonium formate in acetonitrile/water (90:10). The column was equilibrated with 80 % A for 12 min. The gradient elution was done with a linear gradient to 60 % A over 1.0 min, held over 2.0 min, and within 3.0 min to 100 % B, held for 4.0 min and at least within 1.0 min back to 80 % A.

MS/MS analyses were performed using a Triple Quadrupole (API 4000 QTrap, ABI SCIEX) with turbospray ionisation by ESI Turbo Ion spray Interface (SCIEX, Canada) in negative ionisation mode. Selected MRM transitions (precursor ion > fragment ion)  $[\text{M-H}]^- > [\text{M-H-SO}_3]^-$  and their putative identity are shown in Table 3.

Table 3: Selected transitions used for LC-MS/MS analyses and their putative identity, if YTXs exist with the identical mass transitions they are shown in parentheses

[M-H] <sup>+</sup> >[M-H-SO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	putative YTX analogue
991.5 > 911.5	nor ring A YTX enone
1047.5 > 967.5	41-keto YTX (keto YTX enone)
1049.5 > 969.5	no proposed structure, ATX
1061.5 > 981.5	1-desulfoYTX (keto 1a-homoYTX, or 9-Me-YTX enone)
1085.5 > 1005.5	nor ring A YTX
1101.5 > 1021.5	trnor YTX
1117.5 > 1037.5	44-oxotrinor YTX
1131.5 > 1051.5	45-OH-dinor YTX (41a-homo-44-oxotrinor YTX)
1141.6 > 1061.6	YTX
1143.5 > 1063.5	no proposed structure
1155.5 > 1075.5	1-homo YTX
1157.5 > 1077.5	45-OH YTX
1159.5 > 1079.5	no proposed structure
1169.5 > 1089.5	9-Me-41a-homo YTX
1171.5 > 1091.5	45-OH-1a-homo YTX
1173.5 > 1093.5	COOH YTX
1175.5 > 1095.5	44,55 di OH YTX
1187.5 > 1107.5	COOH-1a-homo YTX
1189.5 > 1109.5	44,55-diOH-41a-homo YTX (45-OH COOH YTX)
1195.5 > 1115.5	no proposed structure
1203.5 > 1123.5	44,55-diOH-9-Me-41a-homo YTX
1273.5 > 1193.5	32-O-arabinofuranosyl YTX
1290.5 > 1210.5	41a-homo YTX amide
1304.5 > 1224.5	9-Me-41a-homo YTX amide
1405.5 > 1325.5	32-O-[arabinofuranosyl-(5'-1'')]-arabinofuranosyl YTX

### 3. Results

#### 3.1. Growth of *P. reticulatum*

*P. reticulatum* from Japan (030717-YB-PR1) displayed the best growth in original L1 medium (C) followed by P-enriched (2 P) medium (Fig. 1). Limited growth was observed at the lowest P-concentration (1/5 P) but also at the second P-limitation (1/2 P). Cultures entered stationary growth at day 26. The growth of *P. reticulatum* isolated in the German Bight was slower compared to *P. reticulatum* from Japan (030717-YB-PR1). At day 26 the cultures did not enter the stationary growth. But the growth was also reduced at the highest P-limitation (1/5 P). In contrast, both culture isolates from the USA showed a different growth, whereas the growth of the strain from Atlantic Ocean (CCMP 1720) was also limited, *P. reticulatum*

from Pacific Ocean (CCMP 1889) grew well up to day 14, thereafter most of the cells died. But cultures of this isolate showed, compared to other strains, differences regarding the growth in dependence on the P-limitation. The higher P-concentrations caused the mentioned dead of the cells and *P. reticulatum* cells of the lowest P-limitation (1/5 P) stayed in the stationary phase up to day 26 (Fig. 1).

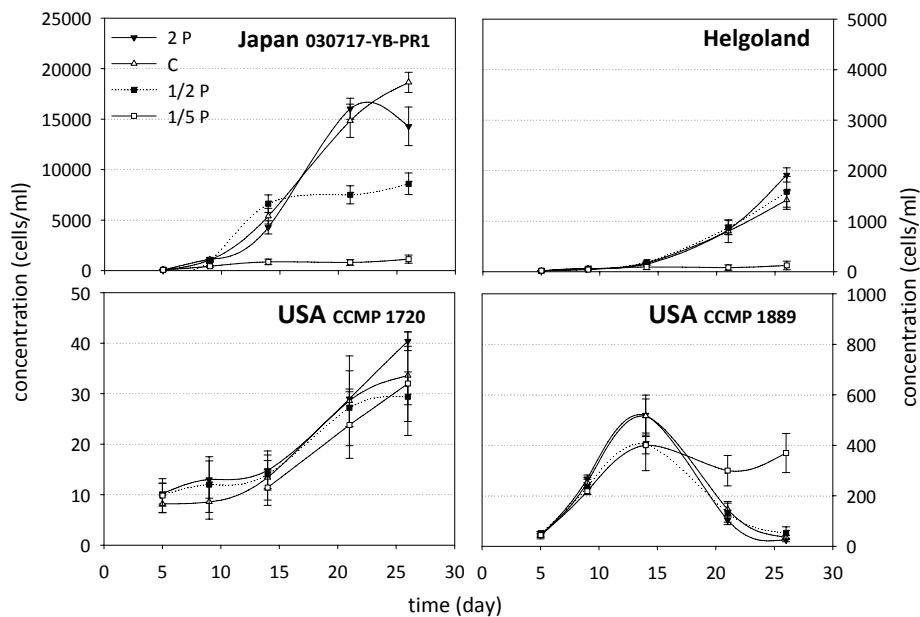


Figure 1: Growth curves of *P. reticulatum* from different geographical areas cultured at four N/P-ratios in L1-media; 2P = twofold the amount of phosphorus, 1/2 P = half the amount of P, 1/5 P = five times less of the amount of P and C = nutrient sufficient media. The error bars represent standard error (n=3). Displayed growth curves are based on cell counting by Sedgwick Rafter's counting chamber.

### 3.2. Changes of cell volume and morphology

In *P. reticulatum* from Japan (03071-YB-PR1) changes of the cell size were observed during culturing. At the beginning of the growth a slight decrease of cell size was found in C, 2P, and 1/2 P media. The cell size tends to increase during the stationary phase (day 21). Culturing in 1/5 P medium led to an increase of the cell size over the time, without an initial decrease (Fig. 2a).

An influence of P-limitation on cell size of *P. reticulatum* from the German Bight was visible at day 26, at which only cells cultured in 1/5 P media displayed an increase of the cell volume. In contrast the cell volume of the other cells, cultured in the 2P-, C-, and 1/2P-media, did not show an increase, or were slightly smaller compared to day 9 (Fig. 2b).

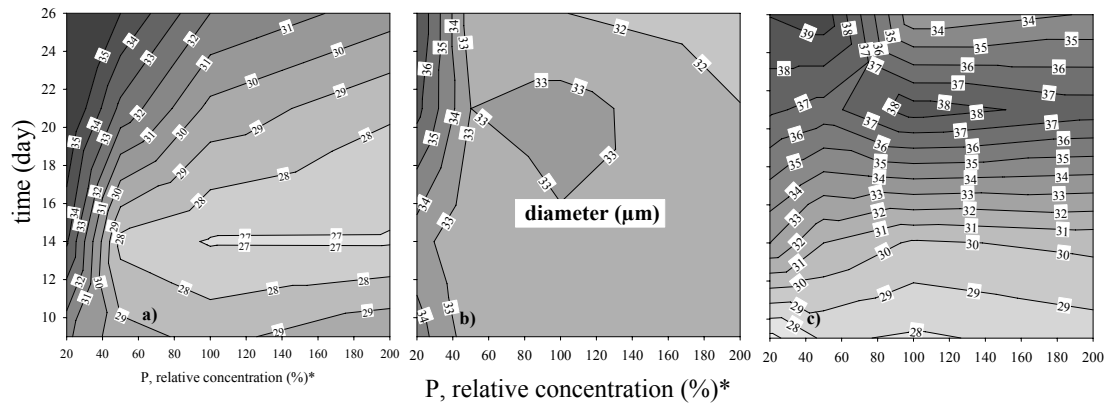


Figure 2: Influence of P-limitation and time on the size of *P. reticulatum* from a) Japan (030717-YB-PR1), b) German Bight (North Sea), c) USA (CCMP 1889) cultured at four N/P-ratios in L1-media. P-concentration relative to the nutrient limitation, whereas nutrient sufficient medium (C) equates 100 %. Cell size obtained by measurement with Flow CAM. Displayed cell counts are based on cell counting by Sedgwick Rafter's counting chamber.

A clear trend of the cell size in dependence on the nutrient limitation was not visible during the experiment in *P. reticulatum* from Atlantic Ocean (CCMP 1720), which is explained by the limited growth of the microalgae and therewith by the low measureable cells per ml. Furthermore, an initial increase of the cell size was detectable in all nutrient concentrations when *P. reticulatum* from Pacific Ocean (CCMP 1889) was under investigation, ending in a slight decrease for non-deficient cultures at the end of the experiment and a further increase in cultures under P-limitation (Fig. 2c).

### 3.3. Toxins in *P. reticulatum* cultures

The most abundant analogue in all strains was YTX but other analogues were detected as minor YTXs (Tab. 4). Due to the low concentrations in the isolates, those analogues will not be discussed in the context of limitation or growth phase. The complex toxin profiles of these and additional strains will be discussed in more detail in a further publication (Roeder et al., in preparation).

Table 4: Detected YTXs in *P. reticulatum* from Japan, Germany and USA, n.d. → not detected, lower than LOD, \* YTX in culture with higher cell density

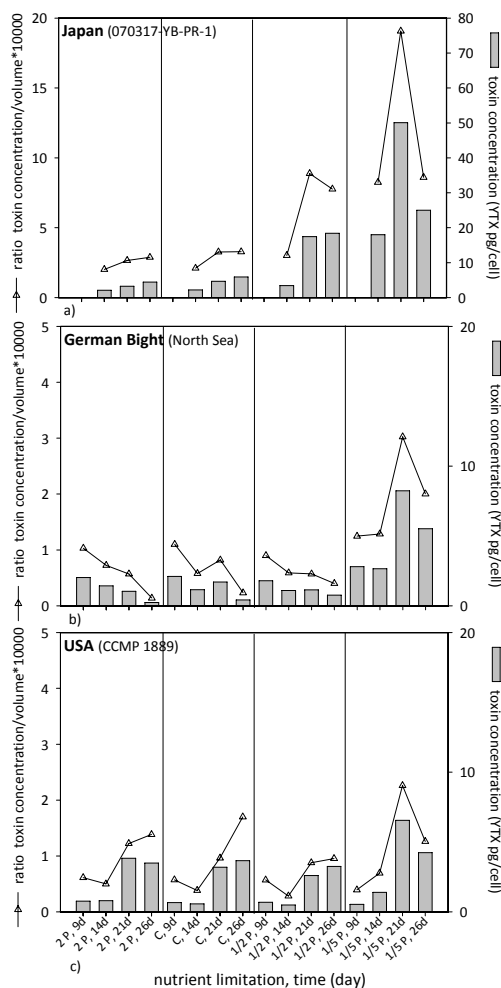
YTX Analogue	Transition	Strain Denotation <i>P. reticulatum</i>			
		Japan (030717-YB-PR-1)	German Bight (North Sea)	USA (CCMP 1889)	USA (CCMP 1720)
YTX	1141.5 > 1061.5	++	+++	++	+
41-keto YTX (keto YTX enone)	1047.5 > 967.5	+	+	+	n.d.
trinox YTX	1101.5 > 1021.5	n.d.	+	n.d.	n.d.
45-OH YTX	1157.5 > 1077.5	+	+	+	n.d.
44,55 di OH YTX	1175.5 > 1095.5	n.d.	+	+	n.d.
32-O-arabinofuranosyl YTX	1273.5 > 1193.5	+	+	+	n.d.

In *P. reticulatum* from Japan (030717-YB-PR1) the YTX cell quota increased with decreased P-concentration. The biggest nutrient effects were observed in 1/5 P medium, where the toxin concentration per cell reached up to ten fold higher levels compared to the nutrient sufficient medium. Similar results were found in 1/2 P medium. A slight increase of YTX cell quotas in 2 P- and C-media during culturing was also observed (Fig. 3a, Tab. 5).

Table 5: Concentration of YTXs (fg/cell or pg/cell) in *P. reticulatum* cultured at different N/P-ratios; n.d. → not detected, lower than LOD

<i>P. reticulatum</i> Strain	Limitation	time (day)			
		9	14	21	26
		Toxin concentration in fg/cell (SD)			
Japan (0307107-YB-PR1)	2 P	n.d.	2.11 (± 0.72)	3.26 (± 0.62)	4.44 (± 1.70)
	C	n.d.	2.20 (± 0.49)	4.66 (± 0.47)	5.91 (± 1.02)
	1/2 P	n.d.	3.41 (± 1.04)	17.45 (± 3.03)	18.40 (± 6.00)
	1/5 P	n.d.	17.98 (± 12.93)	50.09 (± 14.00)	25.03 (± 6.75)
German Bight (North Sea)	2 P	2.03 (± 0.60)	1.43 (± 0.32)	1.04 (± 0.26)	0.24 (± 0.06)
	C	2.10 (± 0.62)	1.15 (± 0.22)	1.71 (± 0.25)	0.42 (± 0.28)
	1/2 P	1.79 (± 0.40)	1.09 (± 0.39)	1.14 (± 0.38)	0.76 (± 0.58)
	1/5 P	2.81 (± 0.47)	2.65 (± 1.69)	8.24 (± 5.38)	5.52 (± 1.38)
USA (CCMP 1889)	2 P	0.77 (± 0.25)	0.80 (± 0.27)	3.84 (± 0.67)	3.49 (± 1.61)
	C	0.67 (± 0.15)	0.58 (± 0.20)	3.19 (± 0.32)	3.66 (± 0.67)
	1/2 P	0.69 (± 0.19)	0.49 (± 0.23)	2.60 (± 0.93)	3.25 (± 0.93)
	1/5 P	0.54 (± 0.40)	1.40 (± 0.39)	6.55 (± 1.67)	4.24 (± 1.25)

The strain from the German Bight exhibited a different response of YTX cell quota to P-limitation over the time. The YTX cell quota in the



limitation over the time. The YTX cell quota in the *P. reticulatum* strain (German Bight) cultured in 2 P, C and 1/2 P media decreased slightly during culturing. Whereas, the higher P-limitation (1/5 P) leads to an increase of the YTX cell quota over the time. On day 26, the YTX cell quota in 1/5 P limited cells were up to 2 fold higher compared to the YTX cell quotas in the nutrient sufficient cultures on day 9, whereby the YTX cell quotas on day 9 represented the highest cell concentrations in nutrient sufficient cultures. But the YTXs cell quotas also reached up to ten fold higher values compared to the 2 P and C media on day 26 (Fig. 3b, Tab. 5).

Figure 3: Concentration of YTX ( $m/z$  1141.4>1061.5) in *P. reticulatum* (15°C) in the stationary phase; control (f/2-media), 1/10 N (N-limited), 1/10 P (P-limited).

In contrast to the differences between the YTX cell quotas of the respective nutrient limitations of *P. reticulatum* from Japan (030717-YB-PR1) and the German Bight, the YTX cell quota of all limitations increased during culturing of *P. reticulatum* from USA (CCMP 1889), independent of the P-limitation. The YTX cell quotas were low during the exponential growth period and increased during culturing; e.g. the YTX concentration per cell was up to 8 fold higher in the 1/5 P medium on day 26 compared to day 9 (Fig 3c, Tab. 5).

Caused by the low cell amount no YTXs were detected in *P. reticulatum* from USA (CCMP 1720).

#### 4. Discussion

The influence of limitation of macronutrients on toxin production was investigated in the past in several dinoflagellate species indicating that both, N and P-limitation can cause changes in the toxin cell quotas of those dinoflagellate species (Anderson et al., 1990, Beani et al., 2000, Boyer et al., 1987, Grzebyk et al., 2003, Maier Brown et al., 2006, Roeder et al., 2009). In contrast earlier studies showed that macronutrients would not influence YTX cell quotas in several strains of *P. reticulatum* (Guerrini et al., 2007, Paz et al., 2006). But previously published investigations by Roeder et al. (submitted) revealed that the *P. reticulatum* strain from the German Bight contained much higher YTX cell quota under P-Limitation.

In general, the influence of P-limitation on the YTX cell quota of *P. reticulatum* isolates of different locations could be demonstrated during the present investigation. The strain from Japan (03717-YB-PR1) reached high cell concentrations with a maximum of about 20,000 cells ml<sup>-1</sup> (Fig. 1). Therefore, we suppose that the influence of P-limitation was strongest within this isolate. And indeed an increase of the YTX cell quota was observed during culturing in both, 1/2 P and 1/5 P-media. To exclude the influence of the cell size on the YTX production, the YTX cell quota was normalized to the cell size and the P-limited cells still contained higher YTX cell quotas compared to the cells cultured in C and 2 P media (Fig. 2a). YTX cell quotas reached maximum levels on day 21 of the experiment; this was attended by the entrance in the stationary phase, or vice versa. Afterwards it seems that the concentration per cell decreased. In connection with the observed deformation of the cells at the end of the stationary phase, a close cell death with down regulated metabolism could be an explanation for the lesser YTX cell quota at the end of the experiment (Fig. 3a, Fig. 4a).

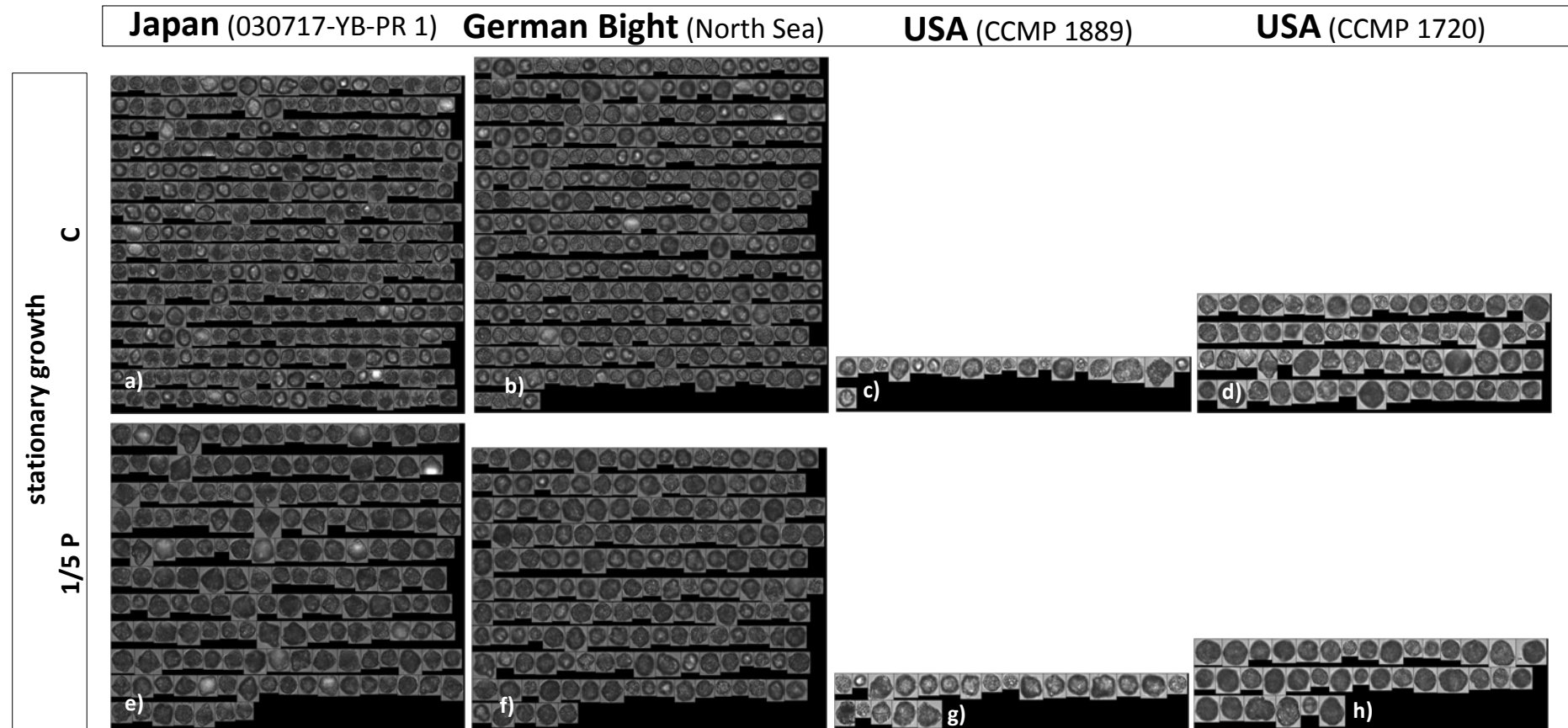


Figure 4: *P. reticulatum* strains cultured in a-d) nutrient sufficient medium (C), e-h) medium containing five time less of the amount of P (1/5 P). Pictures made by Flow CAM.



The strain from Japan was analysed by Suzuki et al. (2007) and results showed that it produces YTX, but no YTX analogues were detected. During this investigation, the putative keto YTX, 45-OH YTX and 32-O-arabinofuranosyl YTX could be detected. But the concentration of YTX per cell was much lower than the earlier reported  $10.3 \text{ pg cell}^{-1}$ . The reason for the lesser toxin cell quota is not clear, but it is established that several parameters influence toxin cell quota as light and salinity. In addition, Suzuki et al. (2007) cultured *P. reticulatum* cells in f/2 medium (see below).

In a previous experiment it was shown that higher temperature can cause inhibition of the growth of the German Bight *P. reticulatum* isolate (Roeder et al., submitted). During the present experiment, the growth of the German Bight isolate was inhibited, probably also caused by the higher temperature. Cultures of 2 P, C and 1/2 P did not enter the stationary phase at the end of the experiment. A potential entrance in the exponential growth period accompanied by a higher division rate and the slight decrease of the cell size could explain the inhibition of the YTX formation in those cells. But an influence of the L1 culture medium, which was not used in previous studies, on the YTX cell quota could not be excluded. L1 medium differs from the f/2 medium by the composition of the trace metal solution (Guillard, 1973 and 1975). Therefore, a direct inhibition of YTX formation by presence of one of the trace metals could be possible. Otherwise, if we suppose that YTX is produced, if other metabolites with similar precursors as YTX could not be produced anymore, those trace metals could be responsible, e.g. as cofactor, for the production of those metabolites and therefore, cause indirectly the inhibition of the YTX formation.

Only the 1/5 P-limited German Bight cultures exhibited higher YTX cell quotas at the end of the experiment, supporting previous investigations (Roeder et al., submitted). During the experiment those cells did not enter the exponential growth period accompanied by a slight increase of the cell size compared to the non deficient cultures, but, as it was also received for the Japanese strain (03717-YB-PR1), this was not compensated by normalizing to the volume (Figs 2b, 3b and 4b, f).

In contrast to these two strains, *P. reticulatum* from USA (CCMP 1889) grew well up to day 14; afterwards most of the cells died but the reason is unexplainable. But meanwhile the remaining cells contained higher YTX cell quotas. The cell size in 2 P-, C-, 1/2 P- media increased up to day 21 and afterwards a slight decrease of the volume was visible, indicating that bigger cells died. In contrast the 1/5 P-limited cultures, characterized by longest

stationary growth, showed an increase of the cell size up to day 26. Due to the low cell concentration in all media, it is not clear whether this strain was nutrient limited or not (Fig. 2c). At day 21, were most of the cells died, an increase of YTX cell quota, which is probably induced by the lower division rate in surviving cells and not by nutrient limitation, was observed (Fig. 3c)

The strain CCMP 1720, characterized by the inhibited growth, seems to have entered a resting stage at the beginning of the investigation and therefore, no differences of the cell sizes between the limitations were observed during culturing (Fig. 4d, h).

Results, observed during this experiment, supported earlier investigations by Roeder et al. (submitted), where it was stated that P-limitation can induce higher YTX cell quotas at optimal temperatures under P-limitation. Similar observations on the influence of P-limitation on toxin cell concentration of nitrogen rich paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins (e.g. by *Alexandrium* spp.) reported that the toxin content was higher at low phosphorus concentrations, which is in accordance with the results of our investigations (Anderson et al., 1990, Beani et al., 2000, Boyer et al., 1987, Grzebyk et al., 2003).

But earlier investigations with focus on the effects of nutrient limitation on the YTX cell quota of *P. reticulatum* did not show such clear results. Guerrini et al. (2007) cultured *P. reticulatum* in f/2 medium, but N and P of the nutrient-replete medium were fivefold diluted compared to the original concentration of the f/2 medium (Guillard, 1975). They observed a limited growth of *P. reticulatum* cells cultured at the lowest P-limitation (N/P 236) accompanied by a slight increase of the YTX cell quota and a 237 % cell volume increase. During this investigation the increase of the YTX cell quota was compensated by normalizing to the cell volume. But the collection of the cells after 21 days in the late stationary phase was the only sampling point. We observed a decrease of YTX cell quota at day 26 compared to day 21 in the Japanese strain (03717-YB-PR1). Therefore, it could not be excluded that the YTX cell quota was higher in cultures of Guerrini et al. (2007) at the beginning of the stationary phase. But Guerrini et al. (2007) also showed that the YTX formation is higher in the stationary phase and also the production of other marine biotoxins was connected with the growth phase, e.g. the concentrations of brevetoxins (BTXs) were higher in the stationary phase (Maier Brown et al., 2006). During this experiment, we could show again that the YTX formation correlates with the growth phases, putatively by an ongoing metabolism in large volume cells (e.g. resting stage cells), which could be found in stationary

phase or P-limited cells; and the formation of marine biotoxins is very complex, as it was reported in earlier investigations by several authors (Anderson et al., 1990, Beani et al., 2000, Boyer et al., 1987, Grzebyk et al., 2003, Maier Brown et al., 2006, Roeder et al., 2009).

## 5. Conclusion

The increase of YTX in P-limited cultures of *P. reticulatum* from Japan (030719-YB-PR1) showed that the P-limitation induced formation of high YTX cell quotas in *P. reticulatum* from the German bight is not a unique phenomenon. Furthermore, the decrease during the exponential growth period in the strain from the German Bight and the increase of YTX cell quota during culturing in the strain from USA (CCMP 1889) indicated that the formation of YTX correlates with the division rate of the cultures and probably higher concentrations of YTX in P-limited cells is caused by an ongoing metabolism in resting stage cells over a certain time.

## References

- ANDERSON, D.M., KULIS, D.M., SULLIVAN, J.J., HALL, S. & LEE, C. (1990). Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp.. *Mar. Biol.*, **104**: 511-524.
- Beani, L., Bianchi, C., Guerrini, F., Marani, L., Pistocchi, R., Tomasini, M.C., Ceredi, A., Milandri, A., Poletti, R. & Boni, L. (2000). High sensitivity bioassay of paralytic (PSP) and amnesic (ASP) algal toxins based on the fluorimetric detection of  $[Ca^{2+}]_i$  in rat cortical primary cultures. *Toxicon*, **38**: 1283-1297.
- BOYER, G.L., SULLIVAN, J.J., ANDERSEN, R.J., HARRISON, P.J. & TAYLOR F.J.R. (1987). Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarens*. *Mar. Biol.*, **96**: 123-128.
- CIMINELLO, P., FATTORUSSO, E., FORINO, M., POLETTI, R., SATAKE, M., VIVIANI, R. & YASUMOTO, T. (1997). Yessotoxin in mussels of the northern Adriatic Sea. *Toxicon*, **35**: 177-183.
- CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; FORINO, M.; MAGNO, S.; POLETTI, R.; VIVIANI, R. (1998). Isolation of Adriatoxin, a New Analogue of Yessotoxin from Mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Lett.*, **39**: 8897-8900.
- CIMINIELLO, P., DELL'AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., FORINO, M., MAGNO, S., GUERRINI, F., PISTOCCHI, R. & BONI, L. (2003). Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic Sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicon*, **42**: 7-14.
- Domínguez, H.J., SOUTO, M.L., NORTE, M., DARANAS, A.H., FERNÁNDEZ, J.J., 2010. *Adriatoxin-B, the first C13 terminal truncated YTX analogue obtained from dinoflagellates*. *Toxicon*. In Press, Accepted Manuscript.

- DRAISCI, R., FERRETTI, E., PALLESCHI, L., MARCHIAFAVA, C., POLETTI, R., MILANDRI, A., CEREDI, A. & POMPEI, M. (1999). High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon*, **37**: 1187-1193.
- EIKI, K., SATAKE, M., KOIKE, K., OGATA, T., MITSUYA, T. & OSHIMA, Y. (2005). Confirmation of yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in Mutsu Bay. *Fish. Science*, **72**: 633-638.
- FINCH, S.C., WILKINS, A.L., HAWKES, A.D., DWAYNE, J.J., MACKENZIE, A.L., BEUZENBERG, V., QUILLIAM, M.A., OLSEN, C.D., SAMDAL, I.A., AASEN, J., SELWOOD, A.I., COONEY, J.M. SANDVIK, M. & MILES, C.O. (2005). Isolation and identification of (44-*R,S*)-44,55-dihydroxyessotoxin from *Protoceratium reticulatum*, and its occurrence in extracts of shellfish from New Zealand, Norway and Canada. *Toxicon*, **46**: 160-170.
- GALLARDO RODRÍGUEZ, J.J., SÁNCHEZ MIRON, A., DEL CARMEN CERON GARCIA, M., HASSAN BELARBI, H., GARCÍA CAMACHO, F., CHISTI, Y. & MOLINA GRIMA, E., (2009). Macronutrients requirements of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*, **8**: 239-246.
- GUERRINI, F., CIMINIELLO, P., DELL'AVERSANO, C., TARTAGLIONE, L., FATTORUSSO, E., BONI, L. & PISTOCCHI, R. (2007). Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in batch-cultures. *Harmful Algae*, **6**: 707-717.
- GUILLARD, R.R.L. & HARGRAVES, P.E. (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* **32**: 234-236.
- GRZEBYK, D., BÉCHEMIN, C., WARD, C.J., VÉRITÉ, C., CODD, G.A. & MAESTRINI, S.Y. (2003). Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *J. Plankt. Res.*, **25**: 1185-1199.
- HOPPENRATH, M. (2004). A revised checklist of planktonic diatoms and dinoflagellates from Helgoland (North Sea, German Bight). *Helgol. Mar. Res.*, **58**: 243-251.
- HOPPENRATH, M., ELBRÄCHTER, M. & DREBES, G. (2009) Marine Phytoplankton. Selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. Kleine Senckenberg-Reihe 49, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele & Obermiller), Stuttgart, 264 pp.
- HOWARD, M.D.A., SILVER, M., & KUDELA, R.M. (2008). Yessotoxin detected in mussel (*Mytilus californicus*) and phytoplankton samples from the U.S. west coast. *Harmful Algae*, **7**: 646-652.
- HWANG, D.F. & LU, Y.H. (2000). Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon*, **38**: 1491-1503.
- KROCK, B., ALPERMANN, T., TILLMANN, U., PITCHER, G.C. & CEMBELLA, A.D. (2006). Yessotoxin (YTX) profiles from cultures and plankton samples of the marine dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Gonyaulax spinifera*. Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, 4-8 September 2006 / Editor-in Chief, Øjvind Moestrup. Copenhagen: International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA) and the IOC of UNESCO, 303-305.
- MACKENZIE, L., TRUMANN, P. & YASUMOTO, T. (1998). Dinoflagellate blooms and associated DSP-toxicity in shellfish in New Zealand. In Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (eds), *Harmful Algae*. Xunda de Galacia, Spain and IOC of Unesco, Paris: 74-77.

- MAIER BROWN, A. F., DORTCH, Q., VAN DOLAH, F.M., LEIGHFIELD, T.A., MORRISON, W. THESSEN, A.E., STEIDINGER, K., RICHARDSON, B., MONCREIFF, C.A. & PENNOCK, J.R. (2006). Effect of salinity on the distribution, growth, and toxicity of *Karenia* spp.. *Harmful Algae*, **5**: 199-212.
- MITROVIC. S.M. , FERNÁNDEZ AMANDI, M., MCKENZIE, L., FUREY, A. & JAMES, K.J. (2004). Effects of selenium, iron and cobalt addition to growth and yessotoxin production of the toxic marine dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **313**: 337-351.
- MITROVIC, S.M., HAMILTON, B., MACKENZIE, L. & FUREY, A., JAMES, K.J. (2005). Persistence of yessotoxin under light and dark conditions. *Mar. Environm. Res.*, **60**: 397-401.
- MURATA, M., KUMAKAI, M., SOO LEE, J. & YASUMOTO, T. (1987). Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedr. Lett.*, **28**: 5869-5872.
- PAZ, B., RIOBÓ, P., FERNÁNDEZ, M.L., FRAGA, S. & FRANCO, J.M. (2004). Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon*, **44**: 251-258.
- PAZ, B., RIOBÓ, P., SOUTO, M.L., GIL, L.V., NORTE, M., FERNANDEZ, J.J. & FRANCO, J.M. (2006). Detection and identification of glycoyessotoxin A in a culture of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, **48**: 611-619.
- Paz, B., Riobó, P., Ffernández, M.L., Fraga, S., FrancoJ.M., Ramilo, I. & Franco, J.M. (2007). Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon*, **50**: 1-17.
- Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Riobó, P., Franco, J.M. & Fernández, J.J. (2008). Yessotoxins, a Group of Marine Polyether Toxins: an Overview. *Marine Drugs*, **6**: 73-102.
- RAMSTAD, H., HOVGAAARD, P., YASUMOTO, T., LARSEN, S. & AUNE, T. (2001). Monthly variations in diarrhetic toxins and yessotoxin in shellfish from coast to the inner part of the Sognefjord, Norway. *Toxicon*, **39**: 1035-1043.
- RHODES, L., McNABB, P., DE SALAS, M., BRIGGS, V., BEUZENBERG, V. & GLADSTONE, M. (2006). Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae*, **5**: 148-155.
- RICCARDI, M., GUERRINI, F., RONCARATI, F., MILANDRI, A., GANGINI, M., RIGOZZI, S., RICCARDI, E., CEREDI, A., CIMINIELLO, P., DELL'AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., FORINO, M., TARTAGLIONE, L. & PISTOCCHI, R. (2009). *Gonyaulax spinifera* from the Adriatic Sea: Toxin production and phylogenetic analysis. *Harmful Algae*, **8**: 279-290.
- ROEDER, K., ERLER, K., KIBLER, S., TESTER, P., VAN THE, H., NGUYEN-NGOC, L., GERDTS, G. & LUCKAS, B. (2009). Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp.. *Toxicon*, **xxx**: 1-8.
- ROEDER, K. GERDTS, G., HANTZSCHE, F.M., GEBÜHR, C., HELBIG, T., KROCK, K., HOPPENRATH, M., LUCKAS, B. Effects of salinity, temperature and nutrients on the yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum* in connection with the cell cycle, cell size and chlorophyll *a* concentration. *Europ. J. Phycol.*, In Progress.
- SAMDAL, I.A., NAUSTVOLL, L.J., OLSENG, C.D., BRIGGS, L.R. & MILES, C.O. (2004). Use of ELISA to identify *Protoceratium reticulatum* as a source of yessotoxin in Norway. *Toxicon*, **44**: 75-82.

- SATAKE, M., TERAWAWA, K., KADOWAKI, Y. & YASUMOTO, T. (1996). Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogues from toxic scallops. *Tetrahedr. Lett.*, **37**: 5955-5958.
- SATAKE, M., MACKENZIE, L. & YASUMOTO, T. (1997). Identification of *Protoceratium reticulatum* as biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Tox.*, **5**: 164-167.
- SATAKE, M., ICHIMURA, T., SEKIGUCHI, K., YOSHIMATSU, S. & OSHIMA, Y. (1999). Confirmation of yessotoxin and 45, 46, 47-trinoryessotoxin production by *Protoceratium reticulatum* in Japan. *Nat. Tox.*, **7**: 147-150.
- SATAKE, M., EIKI, M., ICHIMURA, T., OTA, S., SEKIGUCHI, K., OSHIMA, Y. (2006). Structure of 45, 46, 47-trinorhomoyessotoxin, a new analog, from *Protoceratium reticulatum* which represents the first detection of a homoyessotoxin analog in Japan. *Harmful Algae*, **5**: 731-735.
- SIERACKI, C.K., SIERACKI, M.E., YENTSCH, C.S. (1998). An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **168**: 285-296.
- SIERACKI, C.K., SIERACKI, M.E., YENTSCH, C.S. (1998). An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **168**: 285-296.
- SUZUKI, T., HORIE, Y., KOIKE, K., SATAKE, M., OSHIMA, Y., IWATAKI, M. & SADAOKI, Y. (2007). Yessotoxin analogues in several strains of *Protoceratium reticulatum* in Japan determined by liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry. *J. Chrom. A*, **1142**: 172-177.
- TUBARO, A., SIDARI, L., DELLA LOGGIA, R. & YASUMOTO, T. (1998). Occurrence of homoyessotoxin in phytoplankton and mussels from Northern Adriatic Sea. In *Harmful Algae* (Reguera, B. Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T., editors), 470-472, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Grafisant, Santiago de Compostela.

## 6 Manuskript IV

### **Complex yessotoxins profile in different strains of *Protocerratium reticulatum***

#### **Autoren**

Karin Röder<sup>1</sup>, Gunnar Gerdt<sup>2</sup>, Kazuhiko Koike<sup>3</sup>, Allan Cembella<sup>4</sup>, Bernd Krock<sup>4</sup>, Bernd Luckas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, LS Lebensmittelchemie, Dornburger Straße 25, 07743 Jena, Deutschland

<sup>2</sup> Biologische Anstalt Helgoland, Alfred-Wegener-Institute für Polar- und Meeresforschung, POB 180, 27498 Helgoland, Deutschland

<sup>3</sup> Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8523, Japan

<sup>4</sup> Alfred-Wegener-Institute für Polar- und Meeresforschung, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Deutschland

#### **Korrespondierender Autor:**

Karin Roeder

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, LS Lebensmittelchemie, Dornburger Straße 25, 07743 Jena, Deutschland

Tel.: +49 3641 949 653, Fax: +49 3641 949 652

E-mail address: [Karin.Roeder@uni-jena.de](mailto:Karin.Roeder@uni-jena.de)

**Abstract**

*Protoceratium reticulatum* is a well known producer of yessotoxin (YTX) and its wide variety of analogues. This species is common in several coastal environments around the world and the toxin profile differs in dependence on the origin. In the present study several strains of *P. reticulatum* from Japan, New Zealand, Australia, Norway, Germany, and USA were under investigation to determine the toxin profile with regard to their origin. Therefore the toxin profile of the algae were analysed by high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Characteristic patterns were found in the strains from Japan, which produced YTX 32-O-arabinofuranoxyl YTX, 32-O-diarabinofuranosyl YTX, keto YTX, nor ring A YTX, oxotrinor YTX, 45-OH YTX, 44,55-di OH YTX, 45-OH COOH YTX, 41a-homo YTX amide, and some other minor YTX analogues. In addition, the strains from New Zealand, Australia, Norway, and Germany produced similar YTXs with slight modifications of the composition of the analogues. Especially in the strain from the German Bight (North Sea, Germany) analogues with elimination of several parts of the unsaturated side chain were detected (two keto YTXs, trinor YTX, and oxotrinor YTX). A common analogue was 32-O-arabinofuranosyl YTX with up to 70 % of the total YTXs. Strains from USA produced mainly homo YTX and several minor YTX analogues with known modifications at the unsaturated side chain.

Keywords: Marine toxins; yessotoxin; YTX; 45-hydroxy yessotoxin; carboxy yessotoxin; keto yessotoxin; *Protoceratium reticulatum*; *Gonyaulax grindleyi*; LC-MS/MS



## 1. Introduction

Yessotoxin (YTX), a disulphated polyether toxin was first isolated by Murata et al. (1987) from digestive glands of Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*). Up to now about 100 YTX analogues (YTXs) were isolated from microalgae, phytoplankton and molluscs but only 40 % are characterized concerning their exact chemical structure (Paz et al., 2008).

Three species of dinoflagellates were identified as YTXs producer. These are *Protoceratium reticulatum* (Claparède & Lachmann) Bütschli (syn.: *Gonyaulax grindleyi*) (Satake et al., 1997), *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge (syn.: *Gonyaulax polyedra*) (Tubaro et al., 1998; Draisci et al., 1999) and *Gonyaulax spinifera* (Claparede & Lachmann) Diesing (Rhodes et al., 2006; Riccardi et al., 2009). Meanwhile, the production of YTX by the dinoflagellate *P. reticulatum* has been reported in New Zealand, Japan, Norway, UK, Canada, USA, Spain, Italy, Germany, Chile, and Africa (Ciminiello et al., 2003; Finch et al., 2005; Hoppenrath, 2004; Hoppenrath et al. 2009; Koike et al., 2006; Krock et al., 2006 and 2009; Paz et al., 2004, 2006, 2007; Ramstad et al., 2001; Samdal et al., 2004a; Satake et al., 1997, 1999, 2006).

YTX cell quotas in *P. reticulatum* have been reported to range between 0.9 to 79 pg YTX cell<sup>-1</sup> (Eiki et al., 2005; Howard et al., 2008; MacKenzie et al., 2002; Mitrovic et al., 2005; Paz et al., 2004 and 2007; Samdal et al., 2004a; Satake et al., 1996 and 1999). For *L. polyedrum* and *G. spinifera* YTX cell quotas up to 1.5 pg YTX cell<sup>-1</sup> and up to 200 pg YTX cell<sup>-1</sup> have been determined, respectively (Draisci et al., 1999; Howard et al., 2008; Paz et al., 2004; Ramstad et al., 2001; Rhodes et al., 2006; Tubaro et al., 1998).

Although the major toxin of *P. reticulatum* is YTX, some strains contained homo YTX as prominent analogue (Paz et al., 2008). It was believed that carboxylated and hydroxylated derivatives of YTX and homo YTX are produced by shellfish metabolism (Miles et al., 2004a). However, investigations, by Ciminiello et al. (2003), showed evidence that those oxidised YTX analogues could have an algal origin. It was thought that strains of *P. reticulatum* produce either YTX or homo YTX, but some strains contained homo YTX beside YTX (Ciminiello et al., 2003; Suzuki et al., 2007). Furthermore, several other analogues were detected in strains of the dinoflagellate. In 1999 Satake et al. detected 45,46,47-trinor YTX in *P. reticulatum* and showed that this analogue is a true product of the dinoflagellate. Ciminiello et al. (2002) isolated a 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxo YTX from mussels of the Adriatic Sea and Miles et al. (2004a and b) isolated this analogue and two isomers (40-

epi-heptanor-41-oxo YTX and heptanor-41-oxo YTX 1,3-enone) from *P. reticulatum*. In addition, polyhydroxylated amide YTX analogues (trihydroxylated amides of 41a-homo YTX and 9-methyl-41a-homo YTX) were identified in the *P. reticulatum* strain (Miles et al., 2005a). At least more than 90 putative YTXs, which in tandem mass spectrometric experiments gave characteristic fragment ions, could be detected during this large scale purification of the *P. reticulatum* strain CAWD 40 (Miles et al. 2005b). Several publications reported the production of glycosylated YTXs (32-O-arabinofuranosyl YTX and 32-O-di arabiofuranosyl YTX) (Miles et al., 2005b and 2006a; Samdal et al., 2004b; Souto et al., 2005) (Figs 1 and 2). Besides, 45-hydroxy-46,47-dinoryessotoxin, 44-oxo-45,46,47-trinoryessotoxin, and 9-methyl-42,43,44,45,46,47,55-heptanor-38-en-41-oxoyessotoxin were identified (Miles et al., 2006b).

Suzuki et al. (2007) analysed *P. reticulatum* strains, isolated at different sites of Japanese coasts (e.g. Mutsu Bay and Okirai Bay), which in addition to YTX produce 45,46,47-trinor YTX, 1-homo YTX, 45,46,47-trinor-1-homo YTX. In some strains 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxo YTX (noroxo YTX enone; keto YTX) was also detected and some of the strains contained more than 50 % YTX analogues of the total YTXs concentration (Suzuki et al., 2007). Adriatoxin (ATX), an YTX-like toxin, was isolated from mussels from the Adriatic Sea. The structure of ATX is similar to YTX for ring A to ring J but in contrast the 11'th ether-ring (ring K) is absent. In addition, ATX contains a hydroxyl-group at C-36 and a third sulphate-group at C-37, ring J (Ciminiello et al., 1998). Because ATX was not detected in phytoplankton samples, it was believed that ATX is produced by metabolic degradation in the shellfish tissue. But currently, a *P. reticulatum* strain was identified ATX B-producer indicating that the dinoflagellates are the source of ATX and similar compounds (Dominguez et al., 2010). The structure of ATX B is similar to ATX but the third sulphate group at C-37 is replaced by a methyl-group (Fig. 3).

It is well established that several analogues are present in molluscs, but it is not clear whether their true origin is in the shellfish species or in the phytoplankton. Therefore, intensive research is ongoing to identify the analogues formed by the dinoflagellates. The production of YTXs by dinoflagellates differs from strain to strain and therewith the composition of the analogues (Satake et al., 1999). This behaviour is also established for other toxic dinoflagellates as *Alexandrium* sp. and *Dinophysis* sp. (Lee et al., 1999; Oshima et

al., 1990). In the present investigation several strains of *P. reticulatum* were analysed to elucidate their toxin spectrum with regard to their origin by application of LC-MS/MS.

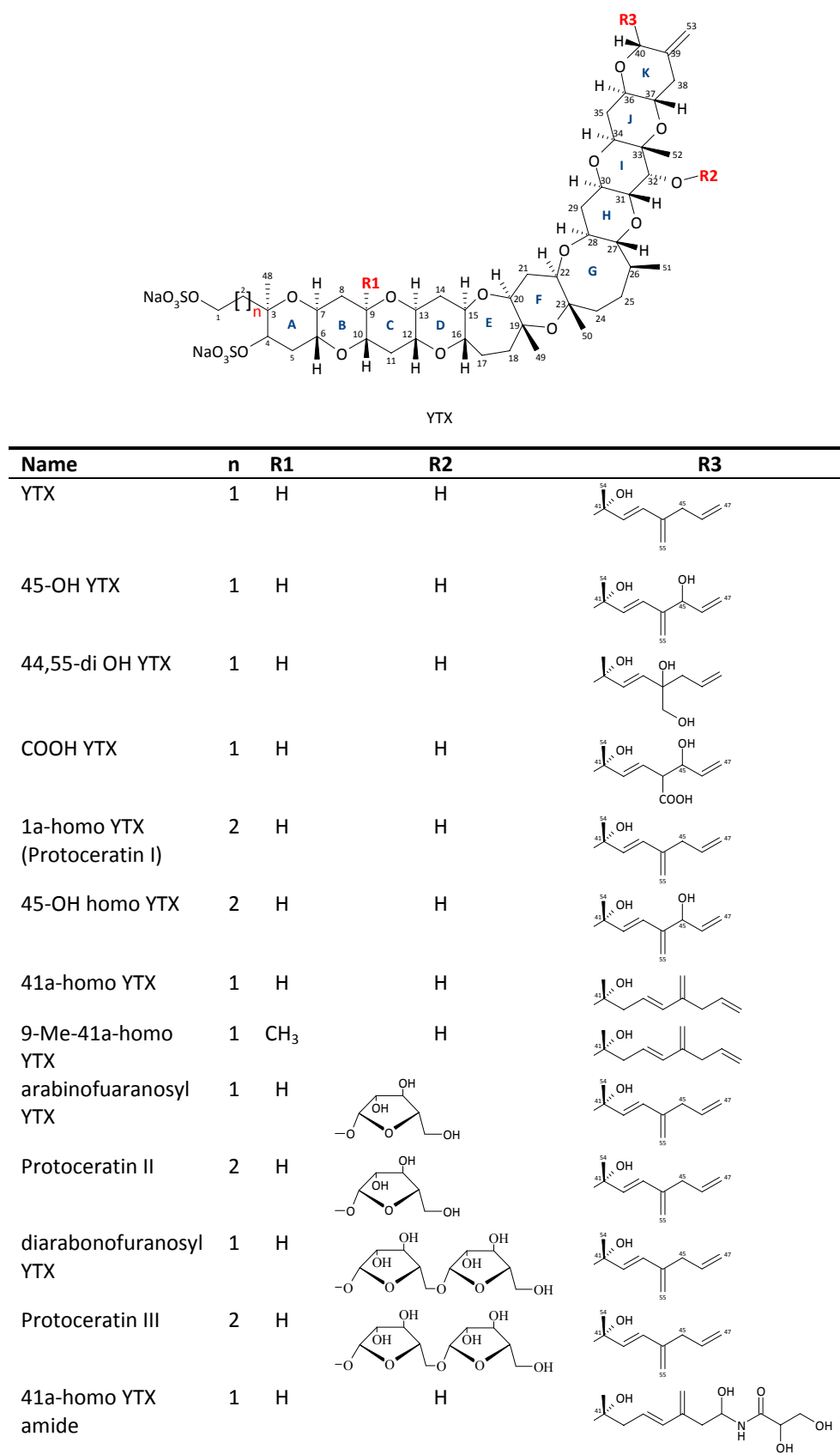
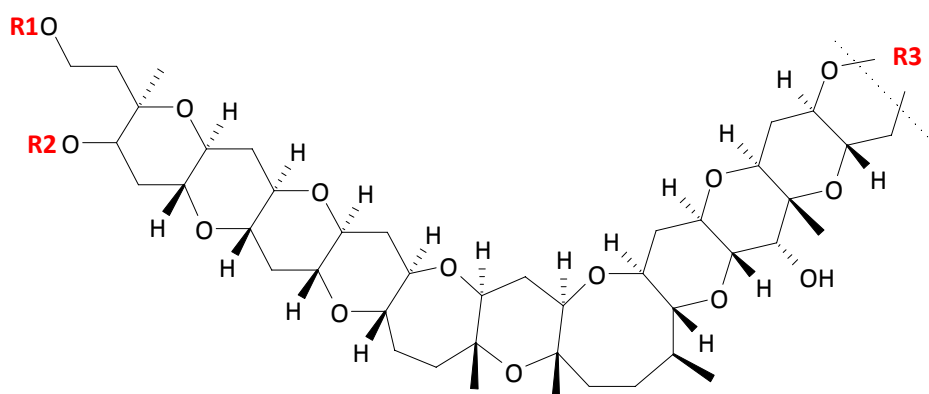


Figure 1: Structures of YTX analogues with modifications at C9, C32 and the unsaturated side chain



Name	R1	R2	R3
45,46,47 trimer YTX	SO <sub>3</sub> Na	SO <sub>3</sub> Na	
41-keto YTX (heptanor-41 oxo YTX)	SO <sub>3</sub> Na	SO <sub>3</sub> Na	
40- <i>epi</i> 41-keto YTX (heptanor-41 oxo YTX)	SO <sub>3</sub> Na	SO <sub>3</sub> Na	
41-keto YTX 1,3enone	SO <sub>3</sub> Na	SO <sub>3</sub> Na	
1-desulfo YTX	H	SO <sub>3</sub> Na	
4-desulfo YTX	SO <sub>3</sub> Na	H	
1,4-desulfo YTX	H	H	

Figure 2: Structures of trimer YTX, keto YTXs and desulfo YTXs

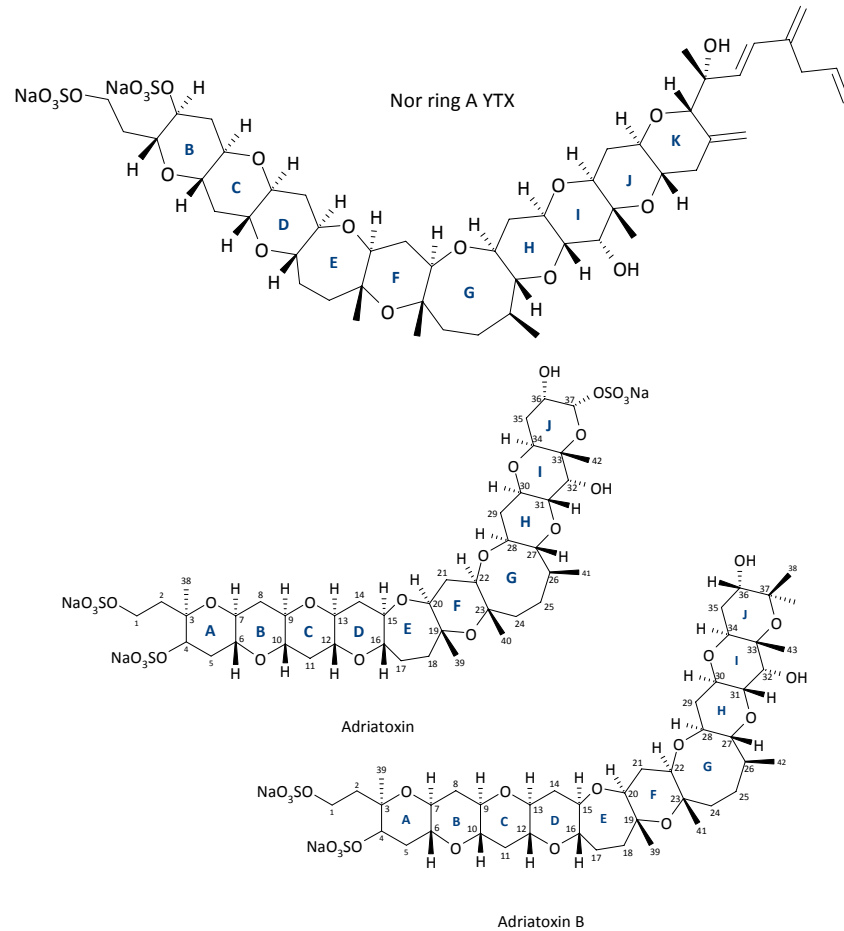


Figure 3: Structures of nor ring A YTX, ATX and ATX B

## 2. Material and Methods

### 2.1 *P. reticulatum* isolates and culturing conditions

Several strains of *P. reticulatum* were analysed (Tab. 1). *P. reticulatum* strain from the German bight (North Sea) was maintained in f/2 medium without silicate at 70–90  $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ , 15 °C and a 12:12 h light/dark regime in 30 % natural seawater (Guillard, 1975, Hoppenrath, 2004, Hoppenrath et al., 2009). The other strains of *P. reticulatum* were maintained in L1-media without silicate (Guillard and Hargraves, 1993) at 18 °C light intensity, light dark regime and salinity had been retained unchanged.

Table 1: Origin of the *P. reticulatum* strains in this investigation

Strain Denotation	Country	Origin
<i>P. reticulatum</i> (German Bight)	Germany	North Sea
CCMP 404	USA	Saline Pool, Salton Sea, California
CCMP 1720		Biscayne Bay, Miami, Florida
CCMP 1889		Friday Harbour, San Juan Island, Washington
CCMP 3113		Florida Keys National Marine Sanctuary, Marquesas Keys, Florida
020603-MB-20-PR-2	Japan	Mutsu Bay, Amori pref
990608-D4		
990615-A1		
990615-A5		
990615-B5		
020619-OK-PR-3		Okkinai Bay, Iwate pref
020717-OK-PR-7		
030717-YB-PR-1		Yamada Bay, Iwate pref
030717-YB-PR-6		
U 10230		
U 10230	Norway	Oslo Fjord 21 (Bente Edvardsen)
CAWD 99	Australia	Derwent Estuary
CAWD 127	New Zealand	Malborough Sounds
CAWD 130		Westport (Strain WP2)

## 2.2. Extraction of yessotoxins and measurement by LC–MS/MS

For extraction of YTXs 200 to 500 ml of the cultures were filtered on GF/C filter (Whatman, GB) under slight vacuum. Filters were extracted according to the method by Roeder et al. (submitted). Certified YTX standard solution, dissolved in MeOH, was obtained from the National Research Council (NRC) Canada (Halifax, Canada). The LC-MS/MS measurement was carried out using a modified method of Krock et al. (2006).

HPLC was carried out with an Agilent 1100 System containing a binary pump, an autosampler with thermostat, and a column oven. The autosampler temperature was set to 6 °C and the column oven temperature to 20 °C, respectively. Liquid chromatography was performed using Luna C8 Column (5 µm, Å, 50 x 2.0 mm) with security guard (Phenomenex, Germany) by gradient elution at a flow of 0.3 ml min<sup>-1</sup>. The injection volume was 5 µl. Mobile phase consists of eluent A: 5 mM ammonium formate in acetonitrile/water (10:90) and of eluent B: 5 mM ammonium formate in acetonitrile/water (90:10). The column was equilibrated with 80 % A for 12 min. The gradient elution was done with a linear gradient to 60 % A over 1.0 min, held over 2.0 min, and within 3.0 min to 100 % B, held for 4.0 min and at least within 1.0 min back to 80 % A.

MS/MS analyses were performed using a Triple Quadrupole (API 4000 QTrap, ABI SCIEX) with turbospray ionisation by ESI Turbo Ion spray Interface (SCIEX, Canada) in negative

ionisation mode. Selected MRM transitions (precursor ion > fragment ion)  $[M-H]^- > [M-H-SO_3]^-$  and their putative identity are shown in Table 2.

Table 2: Mass transitions selected for LC-MS/MS analyses and their putative identity, additional analogues with identical mass transitions are shown in parentheses

$[M-H]^- > [M-H-SO_3]^-$	putative YTX analogue
991.5 > 911.5	nor ring A YTX enone
1047.5 > 967.5	41-keto YTX (keto YTX enone)
1049.5 > 969.5	no proposed structure, ATX
1061.5 > 981.5	1-desulfoYTX (keto 1a-homoYTX, or 9-Me-YTX enone)
1085.5 > 1005.5	nor ring A YTX
1101.5 > 1021.5	trinor YTX
1117.5 > 1037.5	44-oxotrinor YTX
1131.5 > 1051.5	45-OH-dinor YTX (41a-homo-44-oxotrinor YTX)
1141.6 > 1061.6	YTX
1143.5 > 1063.5	no proposed structure
1155.5 > 1075.5	1-homo YTX
1157.5 > 1077.5	45-OH YTX
1159.5 > 1079.5	no proposed structure
1169.5 > 1089.5	9-Me-41a-homo YTX
1171.5 > 1091.5	45-OH-1a-homo YTX
1173.5 > 1093.5	COOH YTX
1175.5 > 1095.5	44,55 di OH YTX
1187.5 > 1107.5	COOH-1a-homo YTX
1189.5 > 1109.5	44,55-diOH-41a-homo YTX (45-OH COOH YTX)
1195.5 > 1115.5	no proposed structure
1203.5 > 1123.5	44,55-diOH-9-Me-41a-homo YTX
1273.5 > 1193.5	32-O-arabinofuranosyl YTX
1290.5 > 1210.5	41a-homo YTX amide
1304.5 > 1224.5	9-Me-41a-homo YTX amide
1405.5 > 1325.5	32-O-[arabinofuranosyl-(5'-1'')]-arabinofuranosyl YTX

### 3. Results

In three of the Japanese strains (990615-A5, 020717-OK-PR-7, and 020603-MB-20-PR-2) none of the selected YTXs could be detected. The major YTX analogues detected in all other analysed *P. reticulatum* cultures were YTX (value for the monoanion  $[M-H]^-$  ( $m/z$ ) 1141.5, retention time (RT) = 5.01 min), homo YTX ( $m/z$  1155.5, RT = 5.03 min) and 32-O-arabinofuranosyl YTX ( $m/z$  1273.5, RT = 4.70 min). YTX was mostly the major analogue and 32-O-arabinofuranosyl YTX was prominent in most of the samples with YTX as the major analogue. This analogue was more than 70 % of the total YTXs in *P. reticulatum* from Norway (Oslo Fjord, U 10230) and from New Zealand (Marlborough Sounds, CAWD 127), whereas the concentration of YTXs in CAWD 127 was low. In some strains also the diglycosilated YTX analogue, 32-O-diarabinofuranosyl YTX ( $m/z$  1405.5, RT = 4.49 min), could be detected. 32-O-arabinofuranosyl YTX could not be detected in the Japanese strain 990608-D4 and the strain from USA CCMP 1720, but concentration of YTX was relative low in those strains (Figs 4, 5 and 6, Tab. 3).

Table 3: Qualitative YTX profiles in different strains of *P. reticulatum*

$[MH]^- > [M-HSO_3]^-$	putative analogue	RT	030707- YB-PR6	990615- A1	990615- B5	030717- YB-PR1	020619- OK-PR3	990608- D4	CAWD 130	CAWD 127	CAWD 99	CCMP 1720	CCMP 3113	CCMP 404	CCMP 1889	U 10230	German Bight
1047.5 > 967.5	keto YTX	4.51		(+)			(+)		(+)							(+)	+
1047.5 > 967.5	keto YTX	4.30	+	+	+	+	+		+							+	+
1061.5 > 981.5	keto 1a-homo YTX	4.31											(+)				
1085.5 > 1005.5	nor ring A YTX	4.96	+	+	+		+										(+)
1101.5 > 1021.5	trinor YTX	4.65															(+)
1117.5 > 1037.5	44-oxo trinor YTX	4.34	(+)		(+)												(+)
1141.6 > 1061.6	YTX	5.01	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++	+	++	++	++	+++
1155.5 > 1075.5	1-homo YTX	5.03					(+)						+++	+++	+	(+)	(+)
1157.5 > 1077.5	45-OH YTX	4.77	+	+	+	+	+	+	+						+	+	+
1159.5 > 1079.5	no proposed structure	4.23		(+)	(+)		(+)		(+)								(+)
1169.5 > 1089.5	9-Me-41a-homo YTX	5.02					(+)										
1171.5 > 1091.5	45-OH-1a-homo YTX	4.78											+				
1173.5 > 1093.5	COOH YTX	4.6															(+)
1175.5 > 1095.5	44,55-di OH YTX	4.24	+	+	+		+	+	+				(+)		+	+	+
1187.5 > 1107.5	COOH-1a-homo YTX	4.83											(+)				
1187.5 > 1107.5	no proposed structure	4.58															(+)
1189.5 > 1109.5	44,55-diOH-41a-homo YTX	4.23											(+)	+			
1189.5 > 1109.5	45-OH COOH YTX	4.40	(+)	(+)	(+)		(+)		(+)						(+)	(+)	(+)
1195.5 > 1115.5	no proposed structure	4.39	(+)	(+)	(+)		(+)		(+)						(+)	(+)	(+)
1203.5 > 1123.5	44,55-diOH-9-Me-41a-homo YTX	4.41											(+)				
1273.5 > 1193.5	arabinofuranosyl YTX	4.70	+	+	+	++	+		++	+++	++				+	+++	+
1290.5 > 1210.5	41a-homo YTX amide	4.73											(+)				
1290.5 > 1210.5	no proposed structure	4.56	+	+	+		+		+							+	(+)
1304.5 > 1224.5	9-Me-41a-homo YTX amide	4.59											+				
1405.5 > 1325.5	di arabinofuranosyl YTX	4.49	(+)	(+)	(+)		(+)		(+)							+	(+)

The *P. reticulatum* strain from the German Bight exhibited a characteristic profile of YTX composition. Beside YTX ( $m/z$  1141.5, RT = 5.01 min) and 32-O-arabinofuranosyl YTX ( $m/z$  1273.5, RT = 4.70 min) several YTXs with modifications at the unsaturated side chain were detected. With the putative identity of two of the keto YTXs ( $m/z$  1047.5, RT = 4.30 and 4.50 min), 45,46,47-trinor YTX ( $m/z$  1101.5, RT = 4.65 min), 44-oxo trinor YTX ( $m/z$  1117.5, RT = 4.34 min), 45-OH YTX ( $m/z$  1157.5, RT = 4.77 min), 44,55-di OH YTX ( $m/z$  1175.5, RT = 4.24 min), 45-OH COOH YTX ( $m/z$  1189.5, RT = 4.40 min), 41a-homo YTX amide ( $m/z$  1290.5, RT =



4.56 min), 32-O-di arabinofuranosyl YTX ( $m/z$  1405.5, RT = 4.49 min), and some other minor analogues (Figs 4a, 6 and 7, Tab. 3). In addition to the common major analogues in *P. reticulatum*, strains from Japan exhibited a characteristic YTX profiles with keto YTX ( $m/z$  1047.5, RT = 4.30 min), nor ring A YTX ( $m/z$  1085.5, RT = 4.96 min), 45-OH YTX ( $m/z$  1157.5, RT = 4.77 min), 44,55-di OH YTX ( $m/z$  1175.5, RT = 4.24 min), 45-OH-COOH YTX ( $m/z$  1189.5, RT = 4.40 min), 32-O-di arabinofuranosyl YTX ( $m/z$  1405.5, 4.49 min), and 41a-homo YTX amide ( $m/z$  1290.5, RT = 4.56 min) as common minor YTXs. Low amounts of the putative keto YTX enone ( $m/z$  1047.5, RT = 4.50 min), 44-oxo trinor YTX ( $m/z$  1117.5, RT = 4.34 min),  $m/z$  = 1195.5 (RT = 4.39 min), and 41a-homo YTX amide ( $m/z$  1290.5, RT = 4.56 min) were detected. Strains from New Zealand (Westport, CAWD 130), USA (CCMP 1889) and Norway (U 10230) showed a very similar pattern with some characteristic differences. The Norwegian strain (U 10230) contained higher proportion of 32-O di arabinofuranosyl YTX ( $m/z$  1405.5, 4.49 min) and in CCMP 1889 low amounts of homo YTX ( $m/z$  1155.5, RT = 5.03 min) could be detected (Figs 4 and 6, Tab. 3).

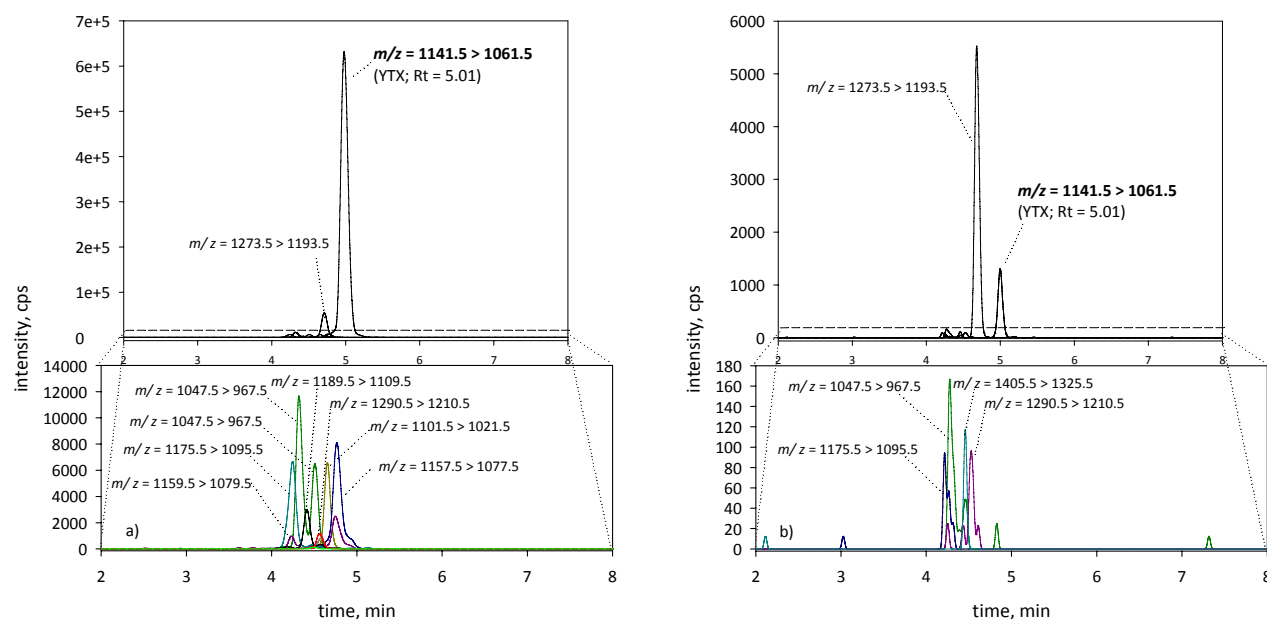


Figure 4: Extracted chromatograms of *P. reticulatum* from: a) German Bight and b) Norway (U 10230). Top: ion traces for YTX ( $m/z$  1141>1061) and 32-O-arabinofuranosyl YTX ( $m/z$  1273>1193), bottom: ion traces of minor constituents

Only two strains contained homo YTX ( $m/z$  1155.5, RT = 5.03 min) as major analogue, both strains were from USA (California, CCMP 404 and Florida, CCMP 3113) (Figs 5b and 6, Tab. 3). In those strains neither 32-O-arabinofuranosyl YTX nor 32-O-diarabinofuranosyl YTX could be detected. But several other YTXs could be detected all belonging to the homo YTX group. The

strain CCMP 404 contained the putative 44,55-di OH-homo YTX ( $m/z$  1189.5, RT = 4.23 min) and the strain CCMP 3113 contained the putative keto 1a-homo YTX ( $m/z$  1061.5, RT = 4.31 min), 45-OH-1a-homo YTX ( $m/z$  1171.5, RT = 4.78 min), and COOH-1a-homo YTX, RT = 4.83 min). In addition the strain CCMP 3113 offered two peaks at  $m/z$  1290.5 and 1304.5, previously described as 41a-homo YTX amide and 9-Me-41a-homo YTX amide. But the RT of  $m/z$  1290.5 (RT = 4.73 min) differed from the RT of  $m/z$  1290.5 of the strains containing YTX as prominent analogue (RT = 4.56 min) (Figs 5b and 6, Tab. 3).

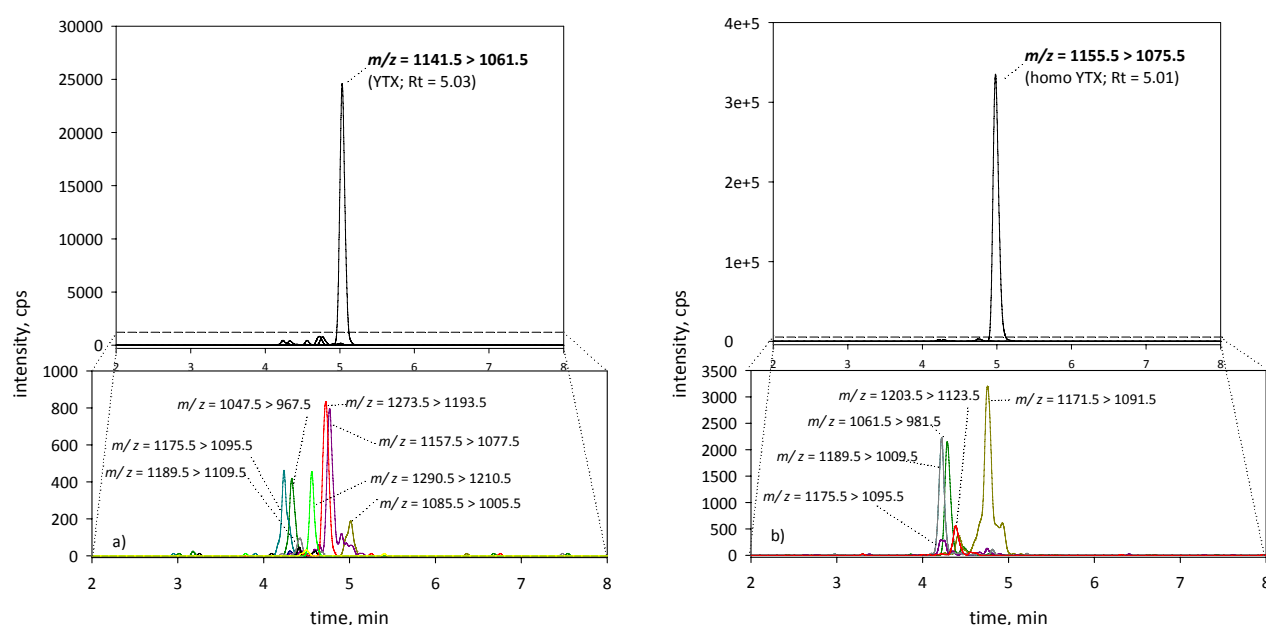


Figure 5: Extracted chromatograms of *P. reticulatum* from: a) Japan (030317-YB-PR6) and b) USA (CCMP 3113). Top: ion traces for YTX ( $m/z$  1141>1061) and homo YTX ( $m/z$  1155>1075), bottom: ion traces of minor constituents

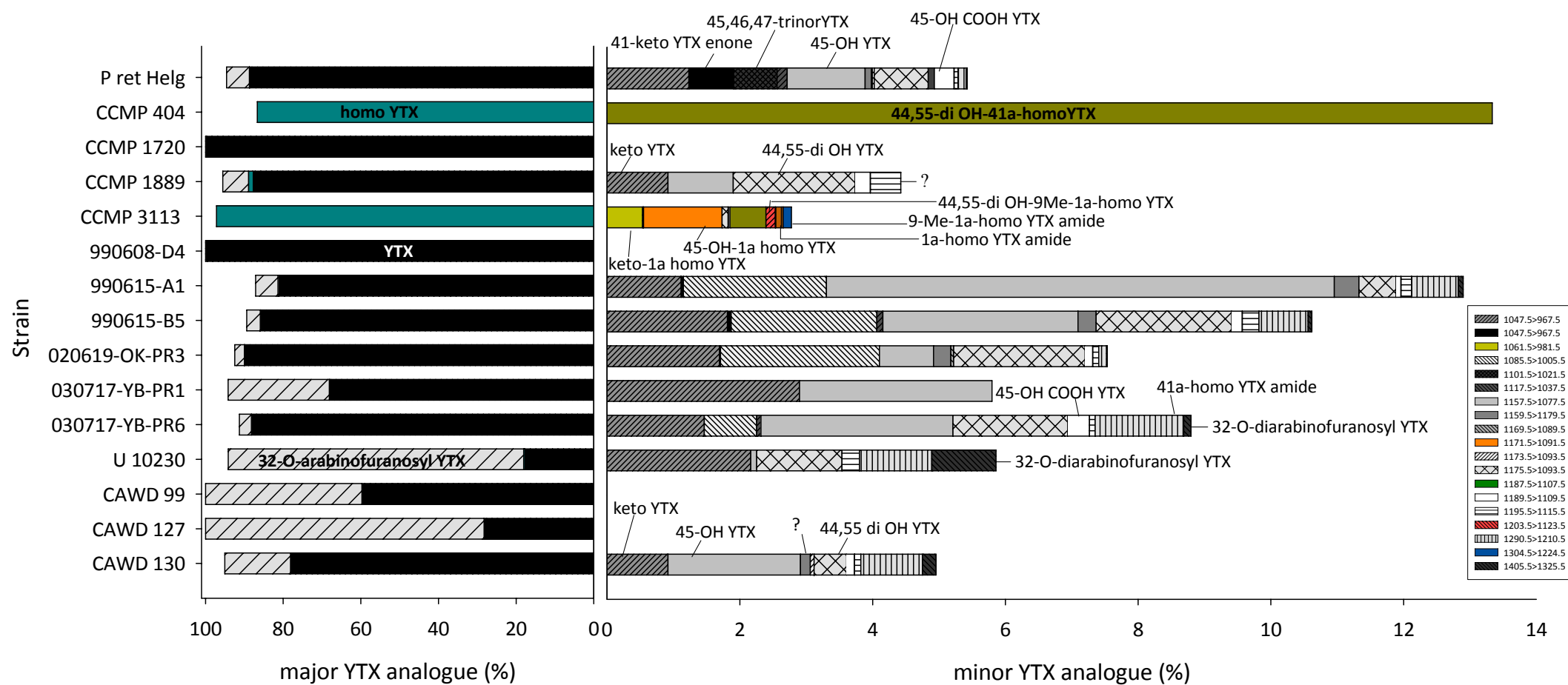


Figure 6: YTX profiles of different strains of *P. reticulatum*, minor and major YTX are depicted in percent of the total amount, legend shows the transition of the respective YTXs as mass to charge ratio ( $m/z$ ) of precursor ion > fragment ion  $[M-H]^+ > [M-H-SO_3]^-$

#### 4. Discussion

In the present investigation several strains of *P. reticulatum* from different geographic locations around the world could be compared in order to investigate their toxin composition. We showed that *P. reticulatum* strains, which produce YTX as major analogue, mostly contained 32-O-arabinofuranosyl YTX in considerable amounts, in some strains more than 70 % of the total YTXs. In addition, some of them contained the diglycosilated 32-O-diarabinofuranosyl YTX. The strains from different locations contained common YTX analogues but in fact they also showed characteristic differences. Most strains contained the putative keto YTX ( $m/z$  1047.5), 45-OH YTX ( $m/z$  1157.5), 44,55-di OH YTX ( $m/z$  1157.5), and 45-OH COOH YTX ( $m/z$  1189.5). The putative 41a-homo YTX amide ( $m/z$  1290.5) was detected in most of the Japanese strains, the New Zealand strain CAWD 130, and the strain from the German Bight. In some of the strains from Japan and New Zealand, where this analogue could not be detected the concentration of the minor YTXs was low, suggesting that large scale cultures could contain more YTX analogues (Fig. 6, Tab. 3).

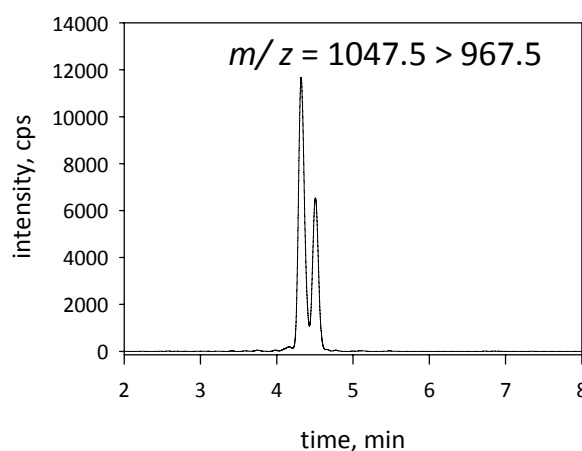


Figure 7: Extracted chromatograms of *P. reticulatum* from the German Bight. Ion traces for the isomers of the putative keto YTXs, RT = 4.3 min and 4.5 min

It was believed that OH and COOH derivatives of YTX were produced by the metabolism in molluscs (Miles et al. 2004a), but investigation by Ciminiello et al. (2003) suggested that COOH and OH YTX derivatives were produced by the algae itself. During this investigation, those analogues were detected in several strains producing YTX and homo YTX. Therefore, the suggestion by Ciminiello et al. (2003) seems to be evidenced.

It is still not clear whether the analogues are produced by the algae itself or if they are a product of spontaneous reaction in the cell or during extraction. Therefore, it seems to be

necessary to elucidate the responsible mechanisms for the YTXs formation in the cell. This is of great interest also regarding the homo YTXs series. Up to now 1a-homo YTX and 41a-homoYTXs were detected in algae and phytoplankton. It was suggested that the production of those analogues is fixed but it was previously demonstrated, that homo YTX was produced beside YTX by *P. reticulatum* (Ciminiello et al., 2003; Suzuki et al, 2007). During this investigation traces of the putative homo YTX ( $m/z$  1155.5) could be detected in strains with YTX as the major analogue (Fig. 6, Tab. 3).

Especially the identical molecular weight of several putative analogues impedes the clear identification of the YTXs; e.g. we detected analogues with  $m/z$  1189.5 in both, YTX and homo YTX producers. We supposed, that the substance in the strains with YTX as the prominent analogue is the putative 45-OH COOH YTX and in the strains with homo YTX as the prominent analogue 44,55-di OH homo YTX, due to the backbone of the major analogue. In addition, two different peaks of the substance with  $m/z$  1290.5 were identified in YTX and homo YTX producing strains. Miles et al. (2005a) detected that analogue in a strain (CAWD 40) mainly producing YTX and it was identified as 41a-homo YTX amide, therefore, it has to be assumed that the substance in the homo YTX could be an 41-a-homo YTX amide-like analogue, e.g. 1a-homo YTX amide. But it has to be clarified whether the substance with  $m/z$  1290.5 ( $RT = 4.73$ ) in the strain CCMP 3113 is the putative 1a-homo YTX amide or not. This is also necessary regarding the analogue with  $m/z$  1304.5 ( $RT = 4.59$ ). Therefore, large scale culturing of the respective cultures is necessary to conduct further investigations like NMR spectral analysis for elucidation of the chemical structure of the respective analogues.

## 5. Conclusion

It was demonstrated that the YTXs composition in strains from several sites depends on the origin of the phytoplankton and many previously described analogues could be detected. *P. reticulatum* strains from Japan showed a characteristic YTXs profile. Also the strains from Norway, New Zealand, Australia, and Germany showed similar analogues with modification in the respective composition. Both strains from USA contained homo YTX as the prominent analogue with typical modifications of the YTX backbone. Now, the identity of the unknown analogues in those strains has to be clarified in more detail.

## Acknowledgement

We are grateful to Dr. Bente Edvardsen for providing the Norwegian strain of *P. reticulatum*.

## References

- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Viviani, R. 1998. Isolation of Adriatoxin, a New Analogue of Yessotoxin from Mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Lett.* 39, 8897-8900.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., 2002. The detection and identification of 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxoyessotoxin, a new marine toxin from Adriatic shellfish, by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* 15, 979–984.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Guerrini, F., Pistocchi, R., Boni, L., 2003. Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic Sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicon* 42, 7-14.
- Domínguez, H.J., Souto, M.L., Norte, M., Daranas, A.H., Fernández, J.J., 2001. Adriatoxin-B, the first C13 terminal truncated YTX analogue obtained from dinoflagellates. *Toxicon* In Press, Accepted Manuscript.
- Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C., Poletti, R., Milandri, A., Ceredi, A., Pompei, M., 1999. High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon* 37, 1187-1193.
- Eiki, K., Satake, M., Koike, K., Ogata, T., Mitsuya, T., Oshima, Y., 2005. Confirmation of yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in Mutsu Bay. *Fish. Science* 72, 633-638.
- Finch, S.C., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Dwayne, J.J., MacKenzie, A.L., Beuzenberg, V., Quilliam, M.A., Olsen, C.D., Samdal, I.A., Aasen, J., Selwood, A.I., Cooney, J.M. Sandvik, M., Miles, C.O., 2005. Isolation and identification of (44-*R,S*)-44,55-dihydroxyessotoxin from *Protoceratium reticulatum*, and its occurrence in extracts of shellfish from New Zealand, Norway and Canada. *Toxicon* 46, 160-170.
- Guillard, R.R., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates., in *Culture of marine invertebrate animals.*, W.L. Smith, Chanley, M.H., Editor. Plenum Press: New York: 29–60.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, 234-26.
- Hoppenrath, M., 2004. A revised checklist of planktonic diatoms and dinoflagellates from Helgoland (North Sea, German Bight). *Helgol. Mar. Res.* 58, 243-251.
- Hoppenrath, M., Elbrächter, M., Drebes, G., 2009. Marine Phytoplankton. Selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. *Kleine Senckenberg-Reihe* 49, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele & Obermiller), Stuttgart, 264 pp.

- Howard, M.D.A., Silver, M., Kudela, R.M., 2008. Yessotoxin detected in mussel (*Mytilus californicus*) and phytoplankton samples from the U.S. west coast. *Harmful Algae* 7, 646-652.
- Koike, K., Horie, Y., Suzuki, T., Kobiyama, A., Kurihara, K., Takagi, K., Kaka, S.-N., Oshima, Y., 2006. *Protoceratium reticulatum* in northern Japan: environmental factors associated with seasonal occurrence and related contamination of yessotoxin in scallops. *J. Plankt. Res.* 28, 103-112.
- Krock, B., Alpermann, T., Tillmann, U., Pitcher, G.C., Cembella, A.D., 2006. Yessotoxin (YTX) profiles from cultures and plankton samples of the marine dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Gonyaulax spinifera*. Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, 4-8 September 2006 / Editor-in Chief, Øjvind Moestrup. Copenhagen: International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA) and the Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC of UNESCO), 303-305.
- Krock, B., Seguel, C.G., Valderrama, K., Tillmann, U., 2009. Pectenotoxins and yessotoxin from Arica Bay, North Chile as determined by tandem mass spectrometry. *Toxicon* 54, 364-367.
- Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T., 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1, 147-152.
- MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T., 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* 40, 1321-1330.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Selwood, A., Jensen, D.J., Aasen, J., Munday, R., Samdal, I.A., Briggs, L.R., Beuzenberg, V., MacKenzie, A.L., 2004a. Isolation of a 1,3-enone isomer of heptanor-41-oxoyessotoxin from *Protoceratium reticulatum* cultures. *Toxicon* 44, 325-336.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Quilliam, M.A., Aasen, J., MacKenzie, A.L., 2004b. Isolation of 41a-Homoyessotoxin and the Identification of 9-Methyl-41ahomoyessotoxin and Nor-ring A-yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1414-1422.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Selwood, A.I., Jensen, D.J., Munday, R., Cooney, J.M. & Beuzenberg, V., 2005a. Polyhydroxylated amide analogs of yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, **45**: 61-71.
- Miles, C.O., Samdal, I.A., Aasen, J.A.G., Jensen, D.J., Quilliam, M.A., Petersen, D., Briggs, L.M., Wilkins, A.L., Rise, F., Cooney, J.M. & MacKenzie, J.A., 2005b. Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4, 1075-1091.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Selwood, A.I., Hawkes, A.D., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Beuzenberg, V., MacKenzie, A.L., 2006a. Isolation of Yessotoxin 32-O-[ $\beta$ -L-arabinofuranosyl-(5'→1'')- $\beta$ -L-arabinofuranoside] from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon* 47, 510-516.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Selwood, A.I., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Beuzenberg, V., MacKenzie, A.L., 2006b. Identification of 45-hydroxy-46,47-dinoryessotoxin, 44-oxo-45,46,47-trinoryessotoxin, and 9-methyl-42,43,44,45,46,47,55-heptanor-38-en-41-

- oxoyessotoxin, and partial characterization of some minor yessotoxins, from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon* 47, 229-240.
- Mitrovic, S.M., Hamilton, B., MacKenzie, L. & Furey, A., James, K.J., 2005. Persistence of yessotoxin under light and dark conditions. *Mar. Environm. Res.* 60, 397-401.
- Murata, M., Kumakai, M., Soo Lee, J., Yasumoto, T., 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedr. Lett.* 28, 5869-5872.
- Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirota, M., Yasumoto, T., 1990. Comparative study of paralytic shellfish toxin profiles of dinoflagellates and contamination shellfish. In: Grane'li E, Sundström B, Edler L, Anderson D, eds. *Toxic Marine Phytoplankton*. New York: Elsevier, 391–396.
- Paz, B., Riobó, P., Fernández, M.L., Fraga, S., Franco, J.M., 2004. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon* 44, 251-258.
- Paz, B., Riobó, P., Souto, M.L., Gil, L.V., Norte, M., Fernandez, J.J., Franco, J.M., 2006. Detection and identification of glycoyessotoxin A in a culture of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon* 48, 611-619.
- Paz, B., Riobó, P., Ramilo, I., Franco, J.M., 2007. Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon* 50, 1-17.
- Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Riobó, P., Franco, J.M., Fernández, J.J., 2008. Yessotoxins, a Group of Marine Polyether Toxins: an Overview. *Marine Drugs* 6, 73-102.
- Ramstad, H., Hovgaard, P., Yasumoto, T., Larsen, S., Aune, T., 2001. Monthly variations in diarrhetic toxins and yessotoxin in shellfish from coast to the inner part of the Sognefjord, Norway. *Toxicon* 39, 1035-1043.
- Rhodes, L., McNabb, P., De Salas, M., Briggs, V., Beuzenberg, V., Gladstone, M., 2006. Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae* 5, 148-155.
- Riccardi, M., Guerrini, F., Roncarati, F., Milandri, A., Gangini, M., Rigozzi, S., Riccardi, E., Ceredi, A., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Pistocchi, R., 2009. *Gonyaulax spinifera* from the Adriatic Sea: Toxin production and phylogenetic analysis. *Harmful Algae* 8, 279-290.
- Samdal, I.A., Naustvoll, L.J., Olseng, C.D., Briggs, L.R., Miles, C.O., 2004a. Use of ELISA to identify *Protoceratium reticulatum* as a source of yessotoxin in Norway. *Toxicon* 44, 75-82.
- Samdal, I.A., Olseng, C.D., Sandvik, M., Miles, C.O., Briggs, L.R., Torgersen, T., Jensen, D.J., 2004b. Profile of yessotoxin analogues in a Norwegian strain of *Protoceratium reticulatum*. In: *Proceedings of the Fifth International Conference on Molluscan Shellfish Safety*, Galway, Ireland, p. 118.
- Satake, M., Terawawa, K., Kadowaki, Y., Yasumoto, T., 1996. Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogues from toxic scallops. *Tetrahedr. Lett.* 37, 5955-5958.



- 
- Satake, M., MacKenzie, L., Yasumoto, T., 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Tox.* 5, 164-167.
- Satake, M., Ichimura, T., Sekiguchi, K., Yoshimatsu, S., Oshima, Y. (1999). Confirmation of yessotoxin and 45, 46, 47-trinoryessotoxin production by *Protoceratium reticulatum* in Japan. *Nat. Tox.*, 7: 147-150.
- Souto, M.L., Fernández, J.J., Franco, J.M., Paz, B., Gil, L.V., Norte, M., 2005. Glycoyessotoxin A, a new yessotoxin derivative from cultures of *Protoceratium reticulatum*. *J. Nat. Prod.* 68, 420-422.
- Suzuki, T., Horie, Y., Koike, K., Satake, M., Oshima, Y., Iwataki, M., Sadaaki, Y., 2007. Yessotoxin analogues in several strains of *Protoceratium reticulatum* in Japan determined by liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry. *J. Chrom. A* 1142, 172-177.
- Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R., Yasumoto, T., 1998. Occurrence of homoyessotoxin in phytoplankton and mussels from Northern Adriatic Sea. In *Harmful Algae* (Reguera, B. Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T., editors), 470-472, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Grafisant, Santiago de Compostela.

**7 Manuskript V**

**Accumulation and metabolism of yessotoxin produced by  
*Protoceratium reticulatum* in Blue mussel (*Mytilus edulis*) and  
Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)**

**Autoren:**

Karin Röder<sup>1</sup>, Nicole Fritz<sup>1</sup>, Gunnar Gerds<sup>2</sup>, Bernd Lucas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, LS Lebensmittelchemie, Dornburger Straße 25, 07743 Jena, Deutschland

<sup>2</sup> Biologische Anstalt Helgoland, Alfred-Wegener-Institute für Polar- und Meeresforschung, POB 180, 27498 Helgoland, Deutschland

**Korrespondierender Autor:**

Karin Roeder

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, LS Lebensmittelchemie, Dornburger Straße 25, 07743 Jena, Deutschland

Tel.: +49 3641 949 653, Fax: +49 3641 949 652

E-mail address: [Karin.Roeder@uni-jena.de](mailto:Karin.Roeder@uni-jena.de)

## Abstract

The contaminations of bivalves with yessotoxins (YTXs) have been reported since 1987 in several coastal environments. In our study we investigated the accumulation and the metabolism of YTXs in two bivalve species important for the German fishery and aquaculture. *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas* were exposed to the yessotoxin (YTX)-producing dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* isolated from the North Sea. Toxin profiles from algae and bivalves were analyzed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). It was evident that 45-hydroxy YTX (45-OH YTX), carboxy YTX (COOH YTX) and the putative 45-hydroxy-carboxy YTX (45-OH-COOH YTX) were the dominant YTX analogues in *M. edulis*. The oyster *C. gigas* displayed a different toxin profile. YTX, 45-OH YTX and 45-OH-COOH YTX were also present but COOH YTX was not detectable. Furthermore, two not yet identified analogues with the same MS/MS transition ( $[M-H]^- \rightarrow [M-H-SO_3]^-$ ) occurred in both bivalve species. Homo YTX and 45-hydroxy-homo YTX which are regulated together with YTX and 45-OH YTX in 2002/225 EC were not detected. Generally, we could confirm former field-investigations on accumulation and metabolism of YTXs in *M. edulis*. However, this is the first study on accumulation and metabolism of YTXs in the oyster *C. gigas*.

Keywords: Marine toxins; shellfish toxicity; yessotoxin; YTX; 45-hydroxy yessotoxin; carboxy yessotoxin; keto yessotoxin; *Protoceratium reticulatum*; *Gonyaulax grindleyi*; Blue mussels; *Mytilus edulis*; Pacific oysters; *Crassostrea gigas*; LC-MS/MS; metabolism

## 1. Introduction

Yessotoxin (YTX), a disulphated polyether toxin was first isolated by Murata et al. (1987) from digestive glands of Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*). Up to the present YTX has been detected in phytoplankton and shellfish from New Zealand (MacKenzie et al., 1998), Japan (Suzuki et al., 2007), Italy (Ciminiello et al., 1997 and 2003), Chile (Yasumoto and Takizawa, 1997), Norway (Aasen et al., 2005), Canada (Paz et al., 2008), USA (Paz et al., 2007), Spain (Paz et al., 2004, 2007) and Africa (Krock et al., 2006).

Three species of dinoflagellates were identified as causative organisms, those are *Protoceratium reticulatum* (Claparede & Lachmann) Buetschli (= *Gonyaulax grindleyi*) (Satake et al., 1997), *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge (= *Gonyaulax polyedra*) (Tubaro et al., 1998; Draisci et al., 1999) and *Gonyaulax spinifera* (Claparede & Lachmann) Diesing (Rhodes et al., 2006; Riccardi et al., 2009). Meanwhile the production of YTX by the dinoflagellate *P. reticulatum* has been reported in New Zealand (Satake et al., 1997), Japan (Satake et al., 1999), Norway (Samdal et al., 2004; Ramstad et al., 2001) and Africa (Krock et al., 2006).

Many different YTX analogues were detected until now, but from about 100 yessotoxins (YTXs) only 40% are characterized concerning their exact chemical structure (Paz et al., 2008). The best known modifications at the YTX-backbone are: insertion of a methyl group between C-1 and C-2 (e.g. 1a-homo YTX) as well as between C-41 and C-42 (e.g. 41a-homo YTX); methylation of C-9 (e.g. 9-Me-41a homo YTX); glycosylation of C-32 (e.g. glyco YTX A); several modifications at the unsaturated side chain (e.g. carboxylation (COOH YTX), hydroxylation (45-OH YTX, 44, 55-di OH YTX); addition of amides (e.g. trihydroxylated amide of 41a-homo YTX); elimination of different parts (e.g. trinor YTX, keto YTX, ketohomo YTX)); absence of ring A (e.g. nor-ring A YTX); desulfonations (e.g. 1- ds YTX, 4-ds YTX) and many variations of the former mentioned (Souto et al., 2005; Miles et al., 2004, 2005a, 2005b, 2006a, 2006b; Ciminiello et al., 2007; Finch et al. 2005). Beside those structural variations, another YTX-like toxin (Adriatoxin; ATX) was isolated from mussels of the Adriatic Sea. The structure of ATX is similar to YTX for ring A to ring J but in contrast the 11'th ether-ring (ring K) is absent. In addition, ATX contains a hydroxyl-group at C-36 and a third sulphate-group at C-37 at ring J (Ciminiello et al., 1998).

YTX is mainly produced by *P. reticulatum*, albeit some strains have been found with homoYTX as the prominent analogue (Paz et al., 2008). The different YTXs are produced by

dinoflagellates to a considerable extent (Suzuki et al., 2007). However, some of them are metabolized in the shellfish tissue (Miles et al., 2004).

The chemical structure of YTX is closely related to other ladder-shaped polyethers like ciguatoxin (CTXs), maitotoxin (MTX), brevetoxins (BTXs) and some diarrhetic shellfish toxins (DSTs). CTXs and BTXs are potent activators of voltage-gated sodium channels (VGSC) in mammals (Naar et al., 2007; Dechraoui et al., 1999; Denac et al., 2000). In contrast, YTX neither causes an activation of this type of ion channels (Inoue et al., 2003) nor inhibits protein phosphatases 1 and 2A which is typical for okadaic acid and dinophysistoxin-1 (Honkanen et al., 1994; Windust et al., 1996; Takai and Mieskes, 1991; Takai et al., 1992). In addition, YTX does not cause fluid accumulation and it is not haemolytic or ichthyotoxic (Ogino et al., 1997). Nevertheless, YTXs are potent cytotoxins (Paz et al., 2008), able to cause damage of the myocardium (Aune et al., 2002; Tubaro et al., 2004). Furthermore, YTX affects  $\text{Ca}^{2+}$  influx in human lymphocytes (De la Rosa et al., 2001), produced a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent decrease of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (Alfonso et al., 2003; Pazos et al., 2005), slows down the disposal of an E-cadherine degradation product (ECRA<sub>100</sub>) (Callegari and Rossini, 2008) and causes neurotoxicity in rat cerebellar neurons (Pérez-Gómez et al., 2006).

Referring to the classical mouse bioassay, YTX was classified into the group of DSTs. However, Satake et al. (1999) discovered that YTX given *per os* does not cause symptoms comparable to other DSTs. Due to these findings, YTX and its analogues were separated from other DSTs in an own toxin category by the scientific community.

In 2002 the European Commission (EC) decided that the limit of YTX and its analogues has to be set up to 1 mg/kg of shellfish meat (EC, 2002). It was considered, that this threshold is valid for YTX and three of its analogues: 45-hydroxyYTX (OH YTX), 1a-homo YTX (homo YTX), and 45-hydroxy-1a-homoYTX (OH-homo YTX). Furthermore, some countries established toxic equivalence factors (TEF) for the mentioned YTXs (YTX = 1, homoYTX = 1, OH YTX = 1 and OH-homo YTX = 0.5; EFSA, 2008). Recently, the European Food Safety Authority (EFSA) published that a 400 g portion of shellfish meat should not contain more than 3.75 mg YTX eq./kg, a concentration higher than that of the current regulation limit (EFSA, 2008).

Independent of the problem of regulation of upper limits for YTXs in seafood it is still a lack of information about the metabolism of YTXs in shellfish. Aasen et al. (2005), Ciminiello et al. (2000) and MacKenzie et al. (2002) reported an accumulation of YTXs in

mussels after blooms of *P. reticulatum*. The results indicated that the accumulation, metabolism and depuration of YTXs depend directly on the toxin composition of the bloom forming dinoflagellates. In this context, temperature and food availability are further factors with influence on the depuration of shellfish contaminated with YTXs (Blanco et al., 1999).

The aim of this study was the elucidation of the mechanism of the accumulation and depuration of YTXs in *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas* of the North Sea important for the German fishery and shellfish industry. Furthermore, it was to clarify the possible metabolic pathway of YTX in different shellfish species.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental setup and sample extractions

#### 2.1.1. *P. reticulatum* cultures

*P. reticulatum* used for the experiments was isolated by M. Hoppenrath from the North Sea. Several cultures were grown sequentially in f/2 medium without silica (Guillard, 1975) at  $60\text{--}90\ \mu\text{mol sec}^{-1}\ \text{m}^{-2}$ ,  $14^{\circ}\text{C}$  and 14:10 h light/dark regime in 10 l borosilicate flasks. After 21 days, the cultures reached mid exponential growth phase and 2 l of the cultures were withdrawn for inoculating each bivalve tank. In addition 90 ml were filtered on GF/C filters (Whatman, GB) for toxin analysis and 10 ml were used to determine cell densities. For determination of the cell density, cells were fixed in Lugol's iodine solution and counted using Sedgwick rafter's counting chamber under light microscope (LM, 10 x magnification), minimum 400 cells have been counted.

#### 2.1.2. Bivalves and experimental conditions

*M. edulis* were collected from Helgoland Roads in the North Sea by scuba diving. *C. gigas* were collected from the tidal zone of the island Sylt (Germany). The intoxication of the bivalves with *P. reticulatum* was carried out in tanks filled up with 25 l of natural seawater. At least we had 2 x 24 samples per species sited in separate tanks. We pooled six individuals of *M. edulis* and handled them in our analyses as one sample.

The size of each bivalve was recorded (*M. edulis*: length =  $5.9 \pm 0.7$  cm, width =  $2.8 \pm 0.4$  cm; *C. gigas*: length =  $8.6 \pm 1.2$  cm, width =  $6.4 \pm 1.2$  cm). To ensure constant water conditions oxygen content and temperature were measured over the whole project

(OxyScan „Graphic“; Umwelt-, Membran- und Sensortechnik Melningen; Germany). The oxygen concentration was  $8 \pm 0.3$  mg/l (Saturation =  $95 \pm 1.4$  %) and the water temperature was  $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

The experiment was subdivided into three parts, the “intoxication period” (16 days), a break (4 days) and the “detoxification period” (16 days) (Figure 1). The sampling was carried out during intoxication (N=2) and detoxification (N=1) every second day. The tanks were cleaned, supplied with new seawater and filled up with bivalves to the prior amount to guaranty constant filtration rates. After sampling the wet weight of each sample was recorded. We fed 2 l of the mid exponential algal culture per tank in the “intoxication period” (Figure 1). Bivalve samples were lyophilized and stored in the freezer at  $-20^\circ\text{C}$  until extraction.



Figure 1: Schematic diagram of sampling (feeding of *P. reticulatum* during the intoxication period every second day; sampling every second day during the intoxication period and the detoxification period)

### 2.1.3. Extraction of Yessotoxins

Lyophilized filters of *P. reticulatum* were extracted with methanol (MeOH) using an ultrasonic bath for 15 min and centrifuged at  $14000 \times g$  for 10 min. Extracts were admitted to 2 ml single-use syringes and filtered through  $0.45 \mu\text{m}$  nylon filter (Carl Roth GmbH & Co, Germany). They were stored at  $-20^\circ\text{C}$  in a brown autosampler vial until measuring by HPLC-MS/MS.

For the extraction of the bivalve samples, lyophilized material was pounded using a mortar. After determination of the dry weight MeOH was added. Accordingly to the weight, 30 ml MeOH were added to *M. edulis* and 20 ml MeOH to *C. gigas*. The samples were vortexed for 1 min and subsequently extracted using a cooled ultrasonic bath for 15 min. To guaranty a good recovery, we allowed soaking over night and extracted them again using an ultrasonic bath (15 min). The extracts were centrifuged at  $12000 \times g$  for 45 min (Sorvall RC-5B Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments, USA). The supernatant was evaporated to

dryness under nitrogen and resolved in 3 ml MeOH by vortexing again for 1 min and afterwards centrifuged for 10 min at 4500 x g (CR-412, refrigerated centrifuge, Jouan, USA). Finally, extracts were filtered through 0.45 µm nylon filters (Carl Roth GmbH & Co, Germany) and stored at -20°C until analysis by LC-MS/MS in brown autosampler vials.

## 2.2. LC–MS/MS analysis

Certified YTX standard solution dissolved in MeOH was obtained from the National Research Council (NRC) Canada.

HPLC was carried out with two LC-10 AT pumps, a SIL-10 AD VP Autosampler, a SCL-10 AT VP Controller and a CTO-10 AS VP Column oven (Shimadzu GmbH, Germany). Liquid chromatography was performed using Hyperclone C8 Column (3 µm, 130 Å, 50 x 2.0 mm) with security guard (Phenomenex, Germany) by gradient elution at a flow of 0.3 ml min<sup>-1</sup>. The injection volume was 10 µl. Mobile phase consists of eluent A: 5 mM ammonium formate in acetonitrile/water (10:90) and of eluent B: 5 mM ammonium formate in acetonitrile/water (90:10). The gradient elution was done with 100 % A for 1.5 min, followed by linear gradient to 40 % A over 3.5 min, held over 5.0 min, and within 1.0 min to 100 % B, held for 9.0 min and at least within 1.0 min back to 100 % A, held for 24 min.

MS/MS analyses were performed using a Triple Quadrupole API 365 LC-MS/MS (Applied Biosystems GmbH, Germany) with electrospray ionisation by ESI Turbo Ion spray Interface (SCIEX, Canada). The following parameters were used: Nebulizer gas (NEB) = 13 l min<sup>-1</sup>, curtain gas (CUR) = 12 l min<sup>-1</sup>, ion spray voltage (IS) = -4500 V, desolvation temperature (TEM) = 450 °C, collisionally activated dissociation-gas (CAD) = 8 l min<sup>-1</sup>, declustering potential (DP) = -12 V, focussing potential = -180 V, entrance potential (EP) = -8 V, collision energy (CE) = -45 V, collision cell exit potential (CXP) = -51 V.

After several scans in the Q1 (stepwise from 500-1800 amu) and measurements in the single ion monitoring (SIM) mode, neutral loss (NL) mode (loss of 80 amu [SO<sub>3</sub>]) and product ion (PI) mode (parent ion: *m/z* 1141.5, scan for fragments *m/z* 500-1200) qualitative analyses were carried out in multi reaction monitoring (MRM) mode with negative ionization. Selected transitions ([M-H]<sup>-</sup>>[M-H-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>: YTX *m/z* 1141.5>1061.5, homo YTX *m/z* 1155.5>1075.5, 45-OH YTX *m/z* 1157.5>1077.5, COOH YTX *m/z* 1173.5>1093.5, the putative 45-OH COOH YTX *m/z* 1189.8>1109.5, *m/z* 1047.5>967.5 (probably keto YTX) and *m/z* 1191.5>1111.5.



The YTX content could be estimated using three point calibration curve. It was determined with certified YTX standard solution (NRC, Canada). Due to the lack of standard solutions for the YTX analogues it was not possible to calculate the absolute amount of YTXs in the shellfish samples. Hence, the LC-MS/MS results for YTXs calculated with reference to the YTX standard solution. Owing to eventually variations in sensitivity for the different YTXs by LC-MS/MS it was not possible to calculate the amounts of YTXs with the MW of the metabolites. Therefore, the concentrations were expressed as YTX equivalents.

### 3. Results

#### 3.1. Toxins in *P. reticulatum* cultures

YTX, MW=1142 Da, was detected in *P. reticulatum* by application of LC-MS/MS, whereby the cells contained  $5.58 \pm 1.66$  pg YTX/cell (N=6). Furthermore, we detected traces (less than 0.3 pg YTX eq./cell) of COOH YTX and the putative keto YTX. The total amount of YTX, 605.97 µg YTX/tank, fed over the whole intoxication period was calculated on the basis of cell densities and YTX load per cell.

#### 3.2. Toxins in bivalves – Accumulation, metabolism and depuration

*M. edulis* contained YTX, 45-OH YTX, COOH YTX and the putative 45-OH COOH YTX. The retention times (Rt) were: YTX  $m/z$  1141.5>1061.5 Rt=21.3 min, 45-OH YTX  $m/z$  1157.5>1077.5 Rt=19.4 min, COOH YTX  $m/z$  1173.5>1093.5 Rt=18.2 min, 45-OH-COOH YTX  $m/z$  1189.8>1109.5 Rt=18.7 min,  $m/z$  1047.5>967.5 Rt=19.5 min and  $m/z$  1191.5>1111.5 Rt=18.2 min. No strong increase of YTXs in the tissue was observed directly after start of the inoculation. The amount of all detected YTXs increased significantly after sixteen days (Figure 2).

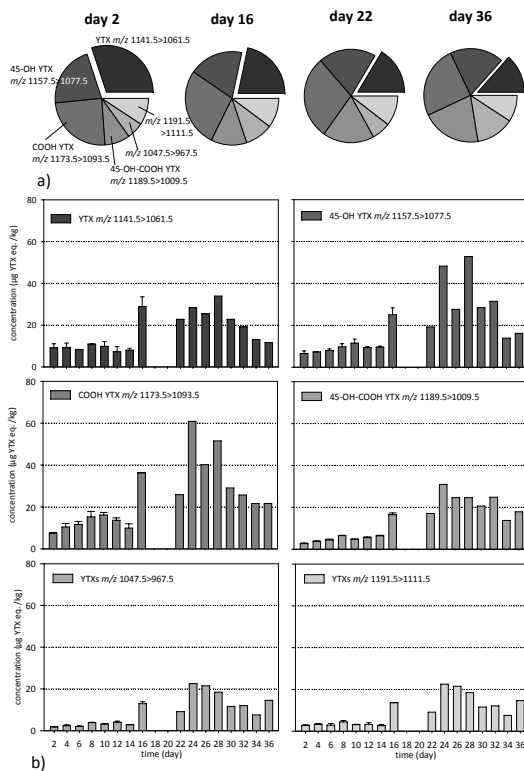


Figure 2: Concentration of YTXs in *M. edulis*: a) as percentage; b) as total concentration in  $\mu\text{g YTX equivalents/kg}$  wet weight; Analogues in YTX-equivalents (YTX Rt = 21.3 min, 45-OH-YTX Rt = 19.4 min, COOH YTX Rt = 18.5 min, 45-OH-COOH YTX Rt = 18.7,  $m/z$  1147.5 > 967.5 Rt = 19.5 and  $m/z$  1147.5 > 967.5 Rt = 18.2)

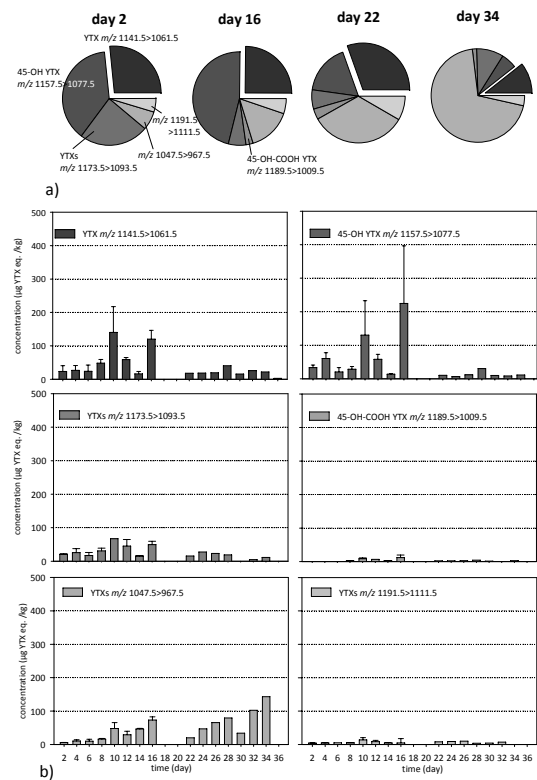


Figure 3: Concentration of YTXs in *C. gigas*: a) as percentage; b) as total concentration  $\mu\text{g YTX equivalents/kg}$  wet weight); Analogues in YTX-equivalents ( $m/z$  1173.5>1093.5; only one of the two YTX analogues at Rt = 18.7 min is shown, all other Rts see Figure 2)

We stopped feeding at day 16 and after a break of four days the concentration of the YTXs did not decrease. Subsequently, the levels of YTX, 45-OH YTX and COOH YTX declined during the detoxification period, whereas the concentration of 45-OH-COOH YTX remained in the same range. *C. gigas* showed a different profile of YTXs compared to *M. edulis*. YTX  $m/z$  1141.5>1061.5, 45-OH YTX  $m/z$  1157.5>1077.5 and 45-OH COOH YTX  $m/z$  1189.8>1109.5 were also present and 45-OH COOH YTX was detectable in low amounts (Table 2, Figure 3). However, COOH YTX  $m/z$  1173.5>1093.5 was not found at Rt=18.2 min, but two signals with the same MRM characteristics (same transition) were observable at the retention times Rt=18.5 min and at Rt=18.9 min, respectively. After the break of 4 days (Figure 1) the dominant YTX analogues (YTX and 45-OH YTX) were almost degraded/eliminated. Ca. 15 % YTX and less than 5 % 45-OH YTX remained. Hence, the detoxification of these YTXs occurs very fast in *C. gigas*.

Additionally, we found two YTX analogues with the typical loss of the sulfo-group (80 amu) in both bivalves (YTX analogues  $m/z$  1047.5>967.5,  $R_t$ =19.5 and  $m/z$  1191.5>1111.5,  $R_t$ =18.2). However, these YTXs were present in *M. edulis* as minor components whereby less amounts of the latter (YTXs  $m/z$  1191.5>1111.5) were accumulated in *C. gigas*. Interestingly, the concentration of the putative YTXs with  $m/z$  1047.5>967.5 increased over both time-periods.

#### 4. Discussion

In the present study, the results of former field-investigations about the metabolism of YTX in Blue mussel (*M. edulis*) could be affirmed (Figure 4). On the other hand, new data were obtained concerning accumulation, metabolism and detoxification in Pacific oyster (*C. gigas*) and a possible metabolic pathway especially in *C. gigas* is under discussion.

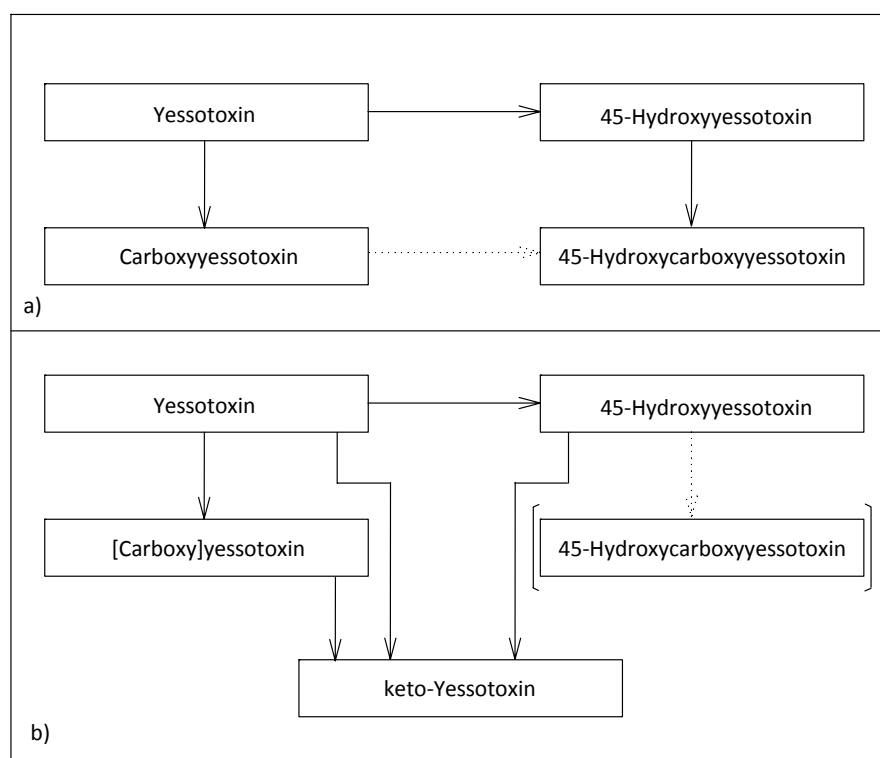


Figure 4: a) Metabolism of YTX in *M. edulis* (Aasen et al., 2002), modified; b) putative metabolism of YTX in *C. gigas*

Aasen et al. (2005) reported 45-hydroxy YTX (45-OHYTX) MW=1058 Da, carboxy YTX (COOH YTX) MW=1174 Da and the putative 45-hydroxy-carboxy YTX (45-OH-COOH YTX) MW=1190 Da as the dominant YTX analogue in *M. edulis*. The metabolism of YTX to 45-OH YTX takes place relatively rapid in the shellfish tissue, whereby a half-life time of YTXs of 20 to 24 days was observed. Furthermore, COOH YTX was more abundant than YTX and

45-OH YTX and consequently it was concluded that detoxification of COOH YTX occurs not so rapid in comparison to YTX and 45-OH YTX (Aasen et al. 2005; Samdal et al., 2005). All YTXs mentioned above were detectable in *M. edulis* in low concentrations until day fourteen. These results are in accordance with former studies (Koike et al., 2006; MacKenzie et al., 1998 and 2001). In our study, YTX was the dominant analogue only over a short time-period. However, after four days the concentration of COOH YTX was higher than the concentration of YTX in *M. edulis*. In addition, 45-OH COOH YTX was present long-lasting in the tissue of *M. edulis* and the concentration of 45-OH COOH YTX measured at the last day of sampling was not lower in comparison to the concentration present at the beginning of the “detoxification period”. This result confirms the assumption that 45-OH-COOH YTX originates from 45-OH YTX (Aasen et al., 2005) and/or COOH YTX (Table 1, Figure 2a and 4 a). The concentration of YTXs in *M. edulis* and *C. gigas* was low in comparison to the concentration of YTXs reported in the literature. Potentially, those lower concentrations measured during our experiments were caused by the relative low concentrations of YTXs in the culture of *P. reticulatum* ( $5.58 \pm 1.66$  pg/cell) and were associated with a smaller amount of cells per litre in comparison to natural blooms.

transition	<i>m/z</i> 1141.5>1061.5	<i>m/z</i> 1157.5>1077.5	<i>m/z</i> 1173.5>1093.5	<i>m/z</i> 1189.5>1089.5	<i>m/z</i> 1047.5>967.5	<i>m/z</i> 1191.5>1111.5
RT (min)	21.3	19.4	18.5	18.7	19.5	18.2
time (day)	c (µg/kg BW)					
2	9,12	6,50	7,42	2,66	1,77	2,81
4	9,18	7,30	10,44	3,69	2,35	3,35
6	8,14	8,01	11,69	4,44	2,03	2,83
8	10,95	9,73	15,24	6,54	3,89	4,42
10	9,89	11,50	16,18	4,74	3,20	3,09
12	7,20	9,38	13,61	5,55	4,07	3,15
14	8,03	9,64	9,91	6,43	2,88	2,63
16	28,92	24,98	36,29	16,50	12,93	13,63
22	22,84	19,24	25,88	17,01	9,06	11,45
24	28,35	48,27	60,84	30,98	22,51	14,17
26	25,40	27,63	40,17	24,65	21,50	14,63
28	33,93	52,86	51,55	24,57	18,42	14,20
30	22,86	28,38	29,07	20,60	11,51	7,95
32	19,14	31,42	25,74	24,86	12,04	13,09
34	13,06	13,85	21,68	13,75	7,57	7,78
36	11,67	16,18	21,64	17,89	14,58	7,98

Table 1: Concentration of YTXs in *M. edulis* in µg YTX equivalents/kg wet weight

As reported by Aasen et al. (2005) a reason for the variation of the data concerning concentrations of YTXs obtained by LC-MS/MS and ELISA analyses could be that further analogues are present in the mussel samples. In this context, two YTX analogues (*m/z* 1047 and *m/z* 1191) could be detected, but the exact chemical structure is not elucidated so far.

We assume that  $m/z$  1047 could be a keto YTX (heptanor-41-oxo YTX; 40-epi-keto YTX or keto YTXenone) with the molecular weight of 1048 Da.

Both bivalve species fed on the same dinoflagellate culture. Nevertheless, differences in the toxin profiles were observed. Apparently, accumulation and detoxification of YTXs in *C. gigas* is faster than in *M. edulis*. Furthermore, *C. gigas* did not produce/accumulate COOH YTX and 45-OH COOH YTX as well as a substance with  $m/z$  1191 were present only in small amounts. The identification of the peaks with COOH YTX-like transitions is foreseen for later analyses. However, there are evidences that the structure is probably related to stereoisomers of COOH YTX. Surprisingly, the concentration of the YTX analogue with  $m/z$  1047 increased during the detoxification period. Potentially, this substance is formed at the end of the detoxification process (Table 2, Figure 4b).

transition	$m/z$ 1141.5>1061.5	$m/z$ 1157.5>1077.5	$m/z$ 1173.5>1093.5	$m/z$ 1189.5>1089.5	$m/z$ 1047.5>967.5	$m/z$ 1191.5>1111.5
RT (min)	21.3	19.4	18.5	18.7	19.5	18.2
time (day)	c (µg/kg BW)					
	RT 21.3	RT 19.4	RT 18.5	RT 18.7	RT 19.5	RT 18.2
	1141,5>1061,5	1157,5>1077,5	1173,5>1093,5	1189,5>1089,5	1047,5>967,5	1191,5>1111,5
2	22,9957	32,9577	20,7702	n.d.	5,5502	4,0623
4	26,3925	60,3217	25,8661	n.d.	10,0437	4,5377
6	23,6591	20,2297	16,9326	n.d.	9,7174	5,5312
8	48,1272	28,4805	31,1131	1,8618	15,7844	5,2078
10	140,1136	130,1616	67,1698	8,2775	47,753	13,9381
12	58,6911	58,3099	45,3156	3,375	28,8491	8,4824
14	16,0673	13,6552	14,951	2,3532	46,5099	4,88
16	120,2502	224,5509	49,5001	11,9154	72,8381	25,4891
22	18,1108	10,3356	15,6555	2,1934	19,8841	4,9884
24	18,4002	6,6721	27,3664	2,29	46,9477	7,8882
26	19,4826	11,814	23,1872	2,5772	65,6668	9,1591
28	40,7945	30,2151	19,2288	4,2141	79,1789	10,1956
30	15,6333	9,6133	n.d.	1,6958	33,7661	3,6367
32	25,5674	8,3727	4,47	n.d.	102,1803	4,3548
34	21,9242	11,1212	11,1645	3,0958	142,8354	7,2244
36	2,8858	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Table 2: Concentration of YTXs in *C. gigas* µg YTX equivalents/kg wet weight, n.d. -> not detected

The metabolism in the Greenshell mussel (*Perna canaliculus*) seems to be similar to the metabolism in *M. edulis*, albeit the process of metabolism is somewhat slower (half-life 49 days). LC-MS/MS analyses by MacKenzie et al. (2002) revealed the presence of YTX and 45-OH-YTX in the Greenshell mussel. Interestingly, the authors found YTX also analogues with  $[M-H]^-$  1173 and 1189. These more polar metabolites of YTX gave the characteristic loss of daughter ions (80 amu) by fragmentation in the mass spectrometer. MacKenzie et al. supposed the YTX substances are COOH YTX and OH-COOH YTX (MacKenzie et al., 2002). Looking at the results by Aasen et al. (2005) and our data this assumption is supported.

Independent of similarities in profiles of YTXs in *M. edulis* and *P. canaliculus*, more YTXs have been detected in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) which is closer related to the *M. edulis* (Ciminiello et al., 2000). Ciminiello et al. reported about accumulation of adriatoxin (ATX) and homo-yessotoxin (homoYTX) besides YTX, OH YTX and COOH YTX in *M. galloprovincialis*, whereas Morton et al. (2007) detected YTX, OH YTX and homoYTX in *M. galloprovincialis*. Finch et al. (2005) reported about the presence of YTX, OH YTX, COOH, and di-OH YTX in all mussel species under investigation with YTX as main component in *M. edulis* and *P. canaliculus* (in every case more than 60 %) and with COOH YTX (40 %) and YTX (32 %) as main components in *M. galloprovincialis*.

Up to now, the knowledge concerning the dependence between YTXs producing dinoflagellates and shellfish with respect to the resulting toxin profile is widely incomplete. In this study the YTXs producer *P. reticulatum*, forms mainly YTX together with very low amounts of YTX analogues. Therefore, we assume that YTX is preferentially metabolized in the shellfish tissue after uptake of *P. reticulatum*. On the other hand, it could not be excluded, that the putative keto YTX, which was present in the culture in low amounts, was accumulated by *C. gigas* and consequently the concentration of this YTX analogue increased in the tissue of *C. gigas* also in absence of *P. reticulatum*.

At the present time lawful upper limits exist for YTX, OH YTX, homo YTX, and OH-homo YTX (EFSA, 2008). However, the potential presence of about 100 YTX analogues in different shellfish species is problematic concerning seafood safety. In Europe testing methods for marine biotoxins were regulated in the Commission Regulation No 2074/2005/EC (EC, 2005). The mouse bioassay (MBA) is the standard method for testing shellfish with regard to lipophilic marine biotoxins. However, other methods (e.g. chromatographical methods and bioassays) could be applied alternatively or supplementary. Yet, differences between results obtained by application of ELISA, MBA or HPLC-MS methods were observed (Samdal et al., 2005; Miles et al., 2005a).

*P. reticulatum* is known to produce YTXs. In previous investigations homo YTX, which was not produced by our strain of *P. reticulatum* isolated from the North Sea, was detected in *P. reticulatum* from New Zealand (Miles et al., 2004). In addition, this strain produces 9-methyl-41a-homo YTX and a nor-ring A YTX. Therefore, it is necessary to enhance the knowledge about the accumulation and metabolism of all YTX analogues such as homo YTX, nor-ring A YTXs and the glyco YTXs.

## 5. Conclusion

The presence of YTX, OH YTX, COOH YTX and OH COOH-YTX in *M. edulis* fed with *P. reticulatum* from the North Sea endorsed the results of studies by Aasen et al. (2002). The exact structure of the detected YTX analogues with  $m/z$  1047.5>967.5,  $m/z$  1191.5>1111.1 should be elucidated in the future. As a result of this first study about accumulation and metabolism of YTXs in *C. gigas* it was obvious that differences exist between *M. edulis* and *C. gigas* concerning the toxin profiles and the rates of detoxification. In comparison to *M. edulis* YTX is faster accumulated and detoxified in *C. gigas*. Consequently, our investigations indicate that accumulation and metabolism of YTXs in different species depend on the toxin profile of the YTXs producing dinoflagellates as well as on the consumers of the algae. *M. edulis* and *C. gigas* were contaminated with YTX, 45-OH YTX and 45-OH-COOH YTX. In addition, the YTX analogues with  $m/z$  1047.5>967.5 and  $m/z$  1191.5>1111.1 were detected in both bivalves and the putative keto YTX (MW=1148 Da) increased in *C. gigas* also during the depuration period. Hence, it is possible that this YTX analogue is a degradation product of other YTX analogues and consequently it is longer detectable in the tissue of *C. gigas*. This fact is of great interest with regard to control of seafood concerning contamination with YTXs.

## References

- Aasen, J., Samdal, I., Miles, C.O., Dahl, E., Briggs, L., Aune, T., 2005. Yessotoxins in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon* 45, 265-272.
- Alfonso, A., de la Rosa, L., Vieytes, M.R., Yasumoto, T., Botana, L.M., 2003. Yessotoxin, a novel Phytotoxin, activates phosphodiesterase activity Effect of Yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 65, 193-208.
- Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H., Landsverk, T., 2002. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxins towards mice. *Toxicon* 40, 77-82.
- Blanco, J., Fenández, M., Míguez, A., Morono, Á., 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 176, 153-163.
- Callegari, F., Rossini, G.P., 2008. Yessotoxin inhibits the complete degradation of E-cadherin. *Toxicology* 244, 133-144.
- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R., Satake, M., Viviani, R., Yasumoto, T., 1997. Yessotoxin in mussels of the northern Adriatic Sea. *Toxicon* 35, 177-183.

- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Viviani, R., 1998. Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic sea. *Tetr. Lett.* 39, 8897-8900.
- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R., Viviani, R., 2000. A New Analogue of Yessotoxin, Carboxyessotoxin, Isolated from Adriatic Sea Mussels. *Eur. J. Org. Chem.* 2, 291-295.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Guerrini, F., Pistocchi, R., Boni, L., 2003. Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic Sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicon* 42, 7-14.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Magno, S.G., Poletti, R., Tartaglione, L., (2007). Desulfoyessotoxins from Adriatic mussels: A new problem for Seafood safety control. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 95-98.
- Dechraoui, M.-Y., Naar, J., Pauillac, S., Legrand, A.-M., 1999. Ciguatoxin and brevetoxins, neurotoxic polyether compound active on sodium channels. *Toxicon* 37, 125-143.
- De la Rosa, L.A., Alfonso, A., Vilarino, N., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2001. Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochem. Pharmacol* 61, 827–833.
- Denac, H., Mevissen, M., Scholtysik, G., 2000. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 453–479.
- Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C., Poletti, R., Milandri, A., Ceredi, A., Pompei, M. (1999). High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon* 37, 1187-1193.
- EC, 2002. Commission decision of 15 March 2002 laying down detailed rules for the implementation of Council Directive 91/492/EEC as regards the maximum levels and the methods of analysis of certain marine biotoxins in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods. (2002/225/EC). *OJ L75*, 62–64.
- EC, 2005. Commission Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004. *OJ L 338*, 27–59.
- EFSA, 2008. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – yessotoxin group. *The EFSA Journal* 907, 1-62.
- Finch, S.C., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Dwayne, J.J., MacKenzie, A.L., Beuzenberg, V., Quilliam, M.A., Olsen, C.D., Samdal, I.A., Aasen, J., Selwood, A.I., Cooney, J.M. Sandvik, M., Miles, C.O., 2005. Isolation and identification of (44-R,S)-44,55-dihydroxyessotoxin from *Protoceratium reticulatum*, and its occurrence in extracts of shellfish from New Zealand, Norway and Canada. *Toxicon* 46, 160-170.
- Guillard, R.R., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates., in *Culture of marine invertebrate animals.*, W.L. Smith, Chanley, M.H., Editor. Plenum Press: New York: 29–60.



- Honkanen, R.E., Codispodi, B.A., Tse, K., Boyton, A.L., 1994. Characterisation of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatase. *Toxicon* 32, 339-350.
- Inoue, M., Hirama, M., Satake, M., Sugiyama, K., Yasumoto, T., 2003. Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A. *Toxicon* 41, 469-474.
- Koike, K., Horie, Y., Suzuki, T., Kobiyama, A., Kurihara, K., Takagi, K., Kaka, S.-N., Oshima, Y., 2006. *Protoceratium reticulatum* in northern Japan: environmental factors associated with seasonal occurrence and related contamination of yessotoxin in scallops. *J. Plankt. Res.* 28, 103-112.
- Krock, B., Alpermann, T., Tillmann, U., Pitcher, G.C., Cembella, A.D., 2006. Yessotoxin (YTX) profiles from cultures and plankton samples of the marine dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Gonyaulax spinifera*. [epic.awi.de/publications/Kro2006g.pdf](http://epic.awi.de/publications/Kro2006g.pdf)
- MacKenzie, L., Trumann, P., Yasumoto, T., 1998. Dinoflagellate blooms and associated DSP-toxicity in shellfish in New Zealand. In Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (eds), *Harmful Algae*. Xunda de Galacia, Spain and Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco, Paris: 74-77.
- MacKenzie, L., Suzuki, T., Adamson, J., 2001. Elimination and differential transformation of yessotoxin by the greenshell mussel *Perna canaliculus* and blue shell mussel *Mytilus galloprovincialis*. In Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (eds), *Harmful Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco, Paris: pp. 371-374.
- MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T., 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* 40, 1321-1330.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Quilliam, M.A., Aasen, J., MacKenzie, A.L., 2004. Isolation of 41a-Homoyessotoxin and the Identification of 9-Methyl-41ahomoyessotoxin and Nor-ring A-yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1414-1422.
- Miles, C.O., Samdal, I.A., Aasen, J.A.G., Jensen, D.J., Quilliam, M.A., Petersen, D., Briggs, L.M., Wilkins, A.L., Rise, F., Cooney, J.M., MacKenzie, J.A., 2005a. Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4, 1075-1091.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Selwoold, A.I., Jenen, D.J., Munday, R., Cooney, J.M., Beuzenberg, V., 2005b. Polyhydroxylated amide analogs of yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon* 45, 61-71.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Selwood, A.I., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Beuzeberg, V., MacKenzie, A.L., 2006 a. Identification of 45-hydroxy-46,47-dinoryessotoxin, 44-oxo-45,46,47-trinoryessotoxin, and 9-methyl-42,43,44,45,46,47,55-heptanor-38-en-41-oxoyessotoxin, and partial characterization of some minor yessotoxins, from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon* 47, 229-240.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Selwood, A.I., Hawkes, A.D., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Beuzenberg, V., MacKenzie, A.L., 2006 b. Isolation of Yessotoxin 32-O-[ $\beta$ -L-arabinofuranosyl-(5'→1'')- $\beta$ -L-arabinofuranoside] from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon* 47, 510-516.

- Morton, S.L., Vershinin, A., Leighfeld, T., Smith, L., Quilliam, M., 2007. Identification of yessotoxin in mussels from the Caucasian Black Sea Coast of the Russian Federation. *Toxicon* 50, 581-584.
- Murata, M., Kumakai, M., Soo Lee, J., Yasumoto, T., 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett.* 28, 5869-5872.
- Naar, J., Leanne, J., Lenzi, A., Abbot, A.G., Jacocks, H., Gannon, D., Henry, M., Pierce, R., Baden, D., Wolny, J., Landsberg, J., 2007. Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish. *Toxicon* 50, 707-723.
- Ogino, H., Kumagai, M., Yasumoto, T., 1997. Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat. Toxins* 5, 255-259.
- Paz, B., Riobó, P., Fernández, M.L., Fraga, S., Franco, J.M., 2004. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon* 44, 251-258.
- Paz, B., Riobó, P., Fernández, M.L., Fraga, S., Franco, J.M., Ramilo, I., Franco, J.M., 2007. Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon* 50, 1-17.
- Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Riobó, P., Franco, J.M., Fernández, J.J., 2008. Yessotoxins, a Group of Marine Polyether Toxins: an Overview. *Marine Drugs* 6, 73-102.
- Pazos, M.A., Alfonso, A., Vieytes, M.R., Yasumoto, T., Botana, L.M., 2005. Kinetic Analysis of the Interaction between Yessotoxin and Analogues and Immobilized Phosphodiesterases Using a Resonant Mirror Optical Biosensor. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1155-1160.
- Pérez-Gómez, A., Ferrero-Gutierrez, A., Novelli, A., Franco, J.M., Paz, B., Fernández-Sánchez, M.T., 2006. Potent Neurotoxic Action of the Shellfish Biotoxin Yessotoxin on Cultured Cerebellar Neurons. *Toxicol. Sciences* 90, 168-177.
- Ramstad, H., Hovgaard, P., Yasumoto, T., Larsen, S., Aune, T., 2001. Monthly variations in diarrhetic toxins and yessotoxin in shellfish from coast to the inner part of the Sognefjord, Norway. *Toxicon* 39, 1035-1043.
- Rhodes, L., McNabb, P., De Salas, M., Briggs, V., Beuzenberg, V., Gladstone, M., 2006. Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae* 5, 148-155.
- Riccardi, M., Guerrini, F., Roncarati, F., Milandri, A., Gangini, M., Rigozzi, S., Riccardi, E., Ceredi, A., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Pistocchi, R., 2009. *Gonyaulax spinifera* from the Adriatic sea: Toxin production and phylogenetic analysis. *Harmful Algae* 8, 279-290.
- Samdal, I.A., Naustvoll, L.J., Olseng, C.D., Briggs, L.R., Miles, C.O., 2004. Use of ELISA to identify *Protoceratium reticulatum* as a source of yessotoxin in Norway. *Toxicon* 44, 75-82.
- Samdal, I.A., Aasen, J.A.B., Briggs, L.R., Dahl, E., Miles, C.O., 2005. Comparison of ELISA and LC-MS analyses for yessotoxins in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon* 47, 7-15.
- Satake, M., MacKenzie, L., Yasumoto, T., 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Natural Toxins* 5, 164-167.

- Satake, M., Ichimura, T., Sekiguchi, K., Yoshimatsu, S., Oshima, Y., 1999. Confirmation of yessotoxin and 45,46,47-trinoryessotoxin production by *Protoceratium reticulatum* collected in Japan. *Natural Toxins* **7**, 147-150.
- Souto, M.L., Fernández, J.J., Franco, J.M., Paz, B., Gil, L.V., Norte, M., 2005. Glycoyessotoxin A, a new yessotoxin derivative from cultures of *Protoceratium reticulatum*. *J. Nat. Prod.* **68**, 420-422.
- Suzuki, T., Horie, Y., Koike, K., Satake, M., Oshima, Y., Iwataki, M., Sadaaki, Y., 2007. Yessotoxin analogues in several strains of *Protoceratium reticulatum* in Japan determined by liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry. *J. Chrom. A* **1142**, 172-177.
- Takai, A., Mieskes, G., 1991. Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases. *Biochem. J.* **275**, 233-239.
- Takai, A., Murata, M., Torigoe, K., Isobe, M., Mieskes, G., Yasumoto, T., 1992. Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. *Biochem. J.* **284**, 539-544.
- Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R., Yasumoto, T., 1998. Occurrence of homoyessotoxin in phytoplankton and mussels from Northern Adriatic Sea. In: Reguera, B. Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Grafisant, Santiago de Compostela, 470-472.
- Tubaro, A., Sosaa, S., Altinier, G., Soranzo, M.R., Satake, M., Della Loggia, R., Yasumoto, T., 2004. Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice. *Toxicon* **43**, 439-445.
- Windust, A. J., Wright, J. L. C., McLachlan, J. L., 1996. The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-1, on the growth of microalgae. *Marine Biology* **126**, 19-25.
- Yasumoto, T. and Takizawa, A., 1997. Fluorometric Measurement of Yessotoxins in Shellfish by High-pressure Liquid Chromatography. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1775-1777.

## 8 Diskussion

### **Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp.**

Zum Nachweis von CTXs in Fischen gibt es inzwischen zahlreiche Analysenmethoden. Die Toxine können beispielsweise mittels *in vivo*-Assays analysiert werden, es werden aber auch oft *in vitro*-Verfahren, wie funktionale Assays und immunochemische Verfahren, eingesetzt. Diese Verfahren basieren auf:

- den Reaktionen der Toxine in lebenden Organismen und dem Feststellen der daraus resultierenden Symptome,
- der Identifikation von spezifischen Folgen einer Exposition in bestimmten Zellen oder
- dem Binden einer bestimmten Region des Toxins mit einem markierten Antikörper (vgl. Kap. 1.3.1-1.3.2).

Mit dem Einsatz dieser Methoden können die verschiedenen Analoga jedoch nicht voneinander unterschieden werden. Deshalb werden hierfür chemische Analysenverfahren eingesetzt, bei denen nach vorangegangener chromatographischer Trennung die Toxine z.B. mittels massenspektrometrischer (MS) Detektion identifiziert und quantifiziert werden (vgl. Kap. 1.3.4). Bei Applikation dieser LC-MS/MS-Analysenmethoden können zusätzliche Informationen über die chemische Struktur der Toxine gewonnen werden. Somit ist eine differenziertere Aussage hinsichtlich der Identität von CTXs in einer bestimmten Probe möglich, was vor allem bei der Vielzahl der CTX-Analoga von Bedeutung ist. Für die Analyse von CTXs aus Fischen wurde von DICKEY eine LC-MS/MS-Methode entwickelt, um C-CTX-1 und P-CTX-1 zu identifizieren [171]. Die Tatsache, dass lt. EU-Verordnung (EG) Nr. 853/2004 mit CTXs belastete Lebensmittel nicht in Verkehr gebracht werden dürfen, verdeutlicht die Notwendigkeit der Entwicklung von Methoden, welche zur Sicherung der Produkte beitragen können [168]. In dieser Verordnung wird jedoch keine Analysenmethode zum Nachweis von CTXs festgelegt. Problematisch ist außerdem, dass es Schwierigkeiten bereitet CTXs-kontaminierte Fische speziell für die Methodenentwicklung zu erhalten. Außerdem verfügen nur wenige Laboratorien über ausreichend Material zur Herstellung von Standardsubstanzen, so dass bis heute kein CTX-Standard kommerziell erhältlich ist.

Weiterhin existieren nur wenige Methoden zur Identifizierung der von *Gambierdiscus* spp. gebildeten Vorläufertoxine. Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit, zunächst eine Methode für die Messung der von *Gambierdiscus* spp. produzierten Vorläufertoxine zu entwickeln, wobei durch Messungen der von *Gambierdiscus* spp. produzierten Toxine mittels LC-MS/MS Informationen über die CTXs in verschiedenen Stämmen erhalten werden sollten. Außerdem wurde untersucht, ob Änderungen der Kultivierungsbedingung einen Einfluss auf die Toxinproduktion haben können. Diese LC-MS/MS-Methode sollte mit leichten Modifikationen auch zur Identifizierung der polareren CTXs anwenbar sein.

Da kein Standard für die Entwicklung eines LC-MS/MS-basierten Nachweisverfahrens für CTXs zur Verfügung stand, wurden BTXs und YTX aufgrund ihrer dem CTX ähnlichen Struktur zur Methodenentwicklung eingesetzt. Die Bestimmung der CTXs erfolgte nach Injektion eines Rohextraktes von *Gambierdiscus toxicus*. Da im Full-Scan-Modus für CTXs bekannte Massenspuren identifiziert werden konnten war es möglich, durch Veränderungen der Parameter die Intensität, die Peakform und die chromatographische Trennung zu verbessern. Mit dieser Methode wurden mehrere Stämme der Gattung *Gambierdiscus* auf das Vorkommen der Vorläufertoxine untersucht. Das Probenmaterial bestand aus verschiedenen Spezies der Gattung *Gambierdiscus* (*G. toxicus*, *G. carpenteri*, *G. caribaeus*, *G. pacificus*, *G. australes* und *G. ruetzeri*). Die Identität von *G. toxicus* aus Vietnam wurde mittels morphologischer Bestimmungen abgesichert (vgl. Kap. 3, S. 3, Abb. 1).

Die Analysen mittels LC-MS/MS ergaben, dass in allen Proben eine Substanz mit dem Molekulargewicht (MW) von 1057 Da vorhanden war. Außerdem enthielt der *G. toxicus*-Stamm aus Vietnam offensichtlich weitere CTX-Analoga. So wurden eine Substanz mit einem MW von 1045 Da und weitere Substanzen (MW = 1061 Da), welche in sehr geringen Konzentrationen vorkamen und chromatographisch nicht getrennt werden konnten, detektiert (vgl. Kap. 3, S. 4, Abb. 3). Weiterhin zeigte sich, dass die Salinität des Kulturmediums offenbar einen starken Einfluss auf das CTX-Profil hat, denn mit steigender Salzkonzentration nahm der Anteil des Analogon mit dem MW von 1045 Da ab (vgl. Kap. 3, S. 4, Abb. 3).

Die CTX-Analoga konnten ohne Vergleich mit einem CTX-Standard nicht eindeutig identifiziert werden. Allerdings wurde die Annahme, dass es sich bei diesen Substanzen um CTXs handelte, durch das Ionisierungsmuster, welches bei Messungen im Full-Scan-Modus erhalten wurde, gestützt. Es wurden die Ionen  $[M+H]^+$ ,  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $[M+H-2H_2O]^+$  sowie ein

Ammoniumaddukt  $[M+NH_4]^+$  identifiziert (vgl. Kap. 3, S. 6, Abb. 5). Deshalb wurde vermutet, dass es sich bei den Substanzen um P-CTX-3C (MW = 1057 Da), P-CTX-4A/B (MW = 1061 Da) handelte. Die Identifizierung der Substanz mit dem MW = 1045 Da bereite die größten Schwierigkeiten. Es wurde zunächst postuliert, dass es sich dabei um 2,3-dihydroxy P-CTX-3C handeln könnte. Da die Retentionszeit nicht mit der vermuteten Retentionszeit übereinstimmte, ist es jedoch auch möglich, dass es sich hierbei z.B. um ein MTX-Fragment handelt.

Es konnte erstmals eine LC-MS/MS-Methode publiziert werden, mit welcher die von *Gambierdiscus* spp. produzierten CTXs getrennt werden können. Außerdem konnten verschiedene Kulturen von *Gambierdiscus* spp. hinsichtlich ihres Toxin-Spektrums miteinander verglichen werden. Es war offensichtlich, dass es charakteristische Unterschiede zwischen dem CTX-Profil der Kultur aus Vietnam und den anderen Kulturen gibt. Allerdings erlauben Analysen, welche mittels massenspektrometrischer Detektion ohne einen geeigneten Standard durchgeführt werden, keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich der exakten Struktur einer Substanz. Im Ergebnis der Messungen der Rohextrakte verschiedener *Gambierdiscus*-Stämme resultierten jedoch die für CTXs typischen Ionisierungsmuster. Es bleibt aber weiterhin die vordringliche Aufgabe, die exakte chemische Struktur der von *Gambierdiscus* spp. produzierten Analoga aufzuklären.

### **Effects of salinity, temperature and nutrients on the yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum* in connection with the cell cycle, cell size and chlorophyll *a* concentration**

*P. reticulatum* ist seit 1997 als YTX-Produzent bekannt, und auch die Identifikation zweier weiterer Dinoflagellaten, *L. polyedrum* und *G. spinifera*, mindert nicht dessen Bedeutung als Hauptverursacher der Anreicherung von YTXs in Schalentierspezies (vgl. 1.2.5) [13, 18].

Es wird vermutet, dass Eutrophikation das Risiko für die Entstehung von HAB's erhöhen kann [8]. In diesem Zusammenhang wird auch der Einfluss steigender Gewässertemperaturen diskutiert [172]. Obwohl bestimmte Mikroalgen wie *P. reticulatum* endemisch sind, existieren nur wenige Berichte über mit marinen Biotoxinen belastetes Material in der Deutschen Bucht. Daher war es das Ziel der Studie herauszufinden, ob eine steigende

Temperatur der Nordsee und eine Veränderung der Verfügbarkeit an Makronährstoffen zu Veränderungen der Wahrscheinlichkeit für eine Algenblüte dieses Dinoflagellaten führen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Temperatur, der Salzgehalt und das N/P-Verhältnis einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum und die Toxinproduktion haben. Offensichtlich ist das Risiko für eine *P. reticulatum*-Blüte mit großen Zelldichten bei niedrigeren Temperaturen während der Frühlingsmonate oder der frühen Sommermonate am wahrscheinlichsten. Ein Temperaturanstieg der Nordsee würde das Risiko für eine Blüte jedoch nicht erhöhen. Da das Wachstum des Dinoflagellaten bei niedrigen Salzkonzentrationen inhibiert wurde, war weiterhin ersichtlich, dass es im Brackwasser ebenfalls nicht zu hohen Zellkonzentrationen kommen wird.

Es existieren nur wenige Studien über den Einfluss autökologischer Bedingungen auf die YTX-Produktion von *P. reticulatum*, und die Ergebnisse zeigten bisher keine eindeutigen Zusammenhänge [109, 173, 174]. Für andere Spezies gibt es jedoch zahlreiche ähnliche Untersuchungen, die den Einfluss von Nährstofflimitierungen auf die Toxinproduktion verdeutlichen. So war die Toxinkonzentration von BTX in Kulturen von *Karenia* spp. in der stationären Phase höher. Die Konzentration der durch *Alexandrium* spp. produzierten Stickstoff (N)-reichen PSP-Toxine wurde durch Phosphat (P)-Limitierung erhöht und durch N-Limitierung erniedrigt [175-179]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Salinität des Kulturmediums einen Einfluss auf das Verhältnis der von *G. toxicus* gebildeten CTXs hat (vgl. Kap. 3, S. 4, Abb. 3).

Es ist bekannt, dass Dinoflagellaten im Allgemeinen einen hohen N-Bedarf haben [180]. Deshalb ist dieser Nährstoff meist auch der wachstumslimitierende Faktor [8]. Die Ergebnisse zeigten aber, dass speziell eine P-Limitierung hohe YTX-Konzentrationen verursacht, während eine N-Limitierung diese nicht hervorruft. Folglich würde eine Blüte, die wegen einer N-Limitierung endete, durch relativ niedrige YTX-Zellkonzentrationen charakterisiert sein. Allerdings könnte eine P-Limitierung in der Nordsee auch während der Sommerblüte auftreten [180].

Es ist bisher nicht geklärt, welche Mechanismen für die Bildung der YTXs verantwortlich sind. Deshalb wurde besonderer Wert auf die Messung von Veränderungen der Zellgröße und der Zell-Morphologie gelegt. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Kulturen während der Wachstumsphasen verschiedene Stadien durchlaufen. Arbeiten von PAZ *et al.* (2006) und GUERRINI *et al.* (2007) ergaben, dass höhere Temperaturen zu einer höheren

Toxinkonzentration führen [109, 181]. Dies stimmt jedoch nicht mit den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen überein. Diese Daten legen nahe, dass der untersuchte Stamm bei höheren Temperaturen Wachstumsdefizite aufweist. Vermutlich ist die Toxinproduktion an einen funktionierenden Metabolismus gekoppelt.

Auch hinsichtlich des Einflusses der P-Limitierung auf die Toxinkonzentration in den Zellen ist diese Vermutung von Bedeutung. Wenn man davon ausgeht, dass die Toxinproduktion generell nur bei funktionierendem Stoffwechsel der Zellen abläuft und nicht durch äußere Einflüsse induziert wird, findet man eine Erklärung für die in P-limitierten Zellen gemessenen erhöhten YTX-Konzentration. Die P-limitierten *P. reticulatum*-Kulturen bei 15 °C zeigten im Gegensatz zu den bei 20 °C kultivierten Kulturen keine Auffälligkeiten hinsichtlich eines baldigen Zelltodes sondern gingen offensichtlich in ein sogenanntes Dauerstadium (Hypnozygote) über. Deshalb kann vermutet werden, dass durch die P-Limitierung lediglich die Zellteilung gestoppt wurde. Da der Metabolismus jedoch weiter funktioniert, können Stoffwechselprodukte wie z.B. Polyketide weiterhin gebildet und angereichert werden.

Ein weiterer Faktor, der nach wie vor kontrovers diskutiert wird, ist die Abgabe von YTX in das Kulturmedium. Es existieren bereits einige Studien, welche die extrazellulären YTX-Konzentrationen im Kulturmedium untersucht haben (vgl. Kap.1.2.5) [110, 181-183]. Dabei gehen die Vermutungen über eine durch Filtration bedingte Zerstörung der Zellen und der daraus resultierenden Freisetzung des Toxins in das Filtrat bis hin zu einer evtl. Abgabe des YTX aufgrund seiner amphoteren Struktur [18]. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stützen die Theorie, dass YTX nicht in großer Menge aktiv in das Medium abgegeben wird, sondern dass die YTX-Konzentration im Medium zunimmt, je mehr Zellen absterben. Vor allem in der stationären Phase wurden bei N-limitierten Kulturen höhere Konzentrationen an YTX im Filtrat gemessen. Im Gegensatz dazu veränderte sich der Anteil des extrazellulären YTX im Filtrat der P-limitierten Zellen, welche in das Dauerstadium (Hypnozygote) übergingen, kaum.

Auch konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass bestimmte Faktoren einen Einfluss auf die gebildeten YTX-Analoga haben. Die Resultate unterschieden sich jedoch von den für *G. toxicus* erhaltenen, denn die Veränderung der Salinität hatte keinen Einfluss auf das Toxin-Profil. Allerdings ergaben sich leichte Verschiebungen in Abhängigkeit von den Nährstofflimitierungen, wobei die Gehalte der YTX-Analoga im Vergleich zu YTX in folgender Reihenfolge abnahmen: N-Limitierung > P-Limitierung > Kontroll-Medium.



Die Ergebnisse zeigten, dass die Bildung der YTXs einen sehr komplexen Prozess darstellt. Dabei hängt die Toxinkonzentration auch vom physiologischen Zustand der Zellen ab. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass die Daten ohne Anwendung neuer Methoden sicherlich weniger aussagekräftig gewesen wären. Zunächst waren die Wachstumskurven mittels *in vivo*-Fluoreszenz zu ermitteln, denn mit dieser Methode konnte in ähnlichen Studien eine gute Korrelation zwischen Zellzahl und Fluoreszenz nachgewiesen werden [184, 185]. Durch den Vergleich dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen der Zellzahlbestimmung durch die Auszählung mittels Sedgewick-Rafter-Zählkammer konnte jedoch gezeigt werden, dass im Verlauf der Kultivierung die Veränderungen der Zellgröße und des Chlorophyllgehaltes von *P. reticulatum* einen großen Einfluss auf die *in vivo*-Fluoreszenz haben, so dass für diesen Fall die Ergebnisse der *in vivo*-Fluoreszenz nicht für die Auswertung herangezogen werden konnten (vgl. Kap. 4, S. 14, Abb. 10). Dies ist auch für zukünftige Experimente von Bedeutung, da zunächst geprüft werden sollte, wie groß der Einfluss der Wachstumsphase und der Nährstofflimitierung auf Faktoren wie Zellgröße und/oder den Chlorophyllgehalt ist.

Hingegen erlaubte die Analyse mittels Flow CAM Aussagen über die Zellgröße und die Morphologie von *P. reticulatum*. Im Vergleich zu der ebenfalls möglichen Bestimmung der Zellgröße mittels Mikroskopie konnten aber mittels Flow CAM wesentlich mehr Zellen vermessen werden. Auch der Einsatz der Durchflusszytometrie, mit der gleichwertige Zellmengen analysiert werden können, bietet nicht die Möglichkeit die Morphologie der lebenden Zellen visuell zu bestimmen. Somit ist speziell das Flow CAM-Verfahren sehr gut für die Auswertung ähnlicher Versuche geeignet. Durch eine weitere Anpassung der Methode lassen sich außerdem noch andere Parameter, wie z.B. die Chlorophyll-Konzentrationen bestimmen.

### **Influence of phosphorus concentration on the yessotoxin formation of different strains of *Protoceratium reticulatum***

Aufgrund der durch P-Limitierung induzierten Steigerung der YTX-Zellkonzentration des in der Deutschen Bucht isolierten *P. reticulatum*-Stammes und der Tatsache, dass frühere Untersuchungen von PAZ *et al.* (2006) und GUERRINI *et al.* (2007) keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen P-Limitierung und YTX-Konzentration nachweisen konnten, sollten

weitere *P. reticulatum*-Isolate hinsichtlich des Einflusses einer P-Limitierung untersucht werden [109, 181]. Hierfür wurden die verschiedenen Stämme in vier Kulturmedien mit unterschiedlichem N/P-Verhältnis kultiviert (vgl. Kap. 5, S. 4, Tab. 2).

Generell bestätigten die Resultate die mit dem *P. reticulatum*-Stamm aus der Nordsee erhaltenen Ergebnisse. Von den vier kultivierten *P. reticulatum*-Stämmen wuchsen zwei besonders gut, und dabei fiel der japanische Stamm (030717-YB-PR1) durch besonders hohe Zellkonzentrationen auf (vgl. Kap. 5, S. 7, Abb. 1). Bei dieser Kultur schien auch der Einfluss des P-Mangels am größten zu sein, denn die YTX-Zellkonzentrationen P-limitierter Kulturen lagen erneut bis zu 10-fach über den YTX-Konzentrationen nicht limitierter Kulturen (vgl. Kap. 5, S. 9, Abb. 3 und Tab. 5).

Eine Kultivierungstemperatur von 18 °C wurde bei diesem Experiment gewählt, da die anderen Isolate aus wärmeren Regionen stammten und deshalb das Wachstumsoptimum bei höheren Temperaturen lag. Diese Temperatur verzögerte zwar das Wachstum der Kultur aus der Deutschen Bucht, dennoch stiegen auch hier die YTX-Konzentrationen unter P-Limitierung an. Hingegen zeigten die beiden Kulturen aus den USA Wachstumsdefizite, und in der Kultur CCMP 1720 reichte die Zellzahl nicht aus, um YTXs während des Experimentes nachweisen zu können. Die Kultur CCMP 1889 wuchs zunächst gut, aber nach 14 Tagen stoppte das Wachstum und die Zellzahl sank. Allerdings war hier der Eintritt in die stationäre Phase ebenfalls von einer Vergrößerung der Zellen sowie der Erhöhung der YTX-Konzentration pro Zelle begleitet. Der Einfluss der P-Limitierung war in diesem Fall jedoch nicht meßbar. Es ist aber möglich, dass die Zellen aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht alle Nährstoffe aufgebraucht hatten, so dass eine Limitierung nicht gegeben war. Überraschenderweise blieb die Zellzahl in der Kultur mit der höchsten P-Limitierung am längsten konstant. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Zellen bereits zu Beginn der Kultivierung in ein Dauerstadium übergegangen waren.

Insgesamt konnte durch die Analysen die Vermutung bestätigt werden, dass eine YTX-Akkumulation in *P. reticulatum* mit seiner fortschreitenden Metabolisierung in teilungsunfähigen Kulturen einhergeht und somit nicht spezifisch durch eine P-Limitierung induziert wird.

Leider reichten die Konzentrationen der Minor-Analoga des YTX in den Kulturen nicht aus, um den Einfluss einer P-Limitierung auf die Verteilung der YTX-Analoga näher zu untersuchen. Es ist bekannt, dass *P. reticulatum* verschiedene YTX-Analoga bilden kann,

bisher ist jedoch nicht abschließend geklärt, in welchem Maße *P. reticulatum* diese produziert und wie sich das Toxinspektrum von Stämmen unterschiedlicher Herkunft unterscheidet.

### **Complex yessotoxins profile in different strains of *Protoceratium reticulatum***

Studien ergaben, dass neben YTX bestimmte YTX-Analoga in z.T. hohen Konzentrationen im Phytoplankton vorliegen können. Dabei scheint die Produktion der homo YTXs, deren Kohlenstoffrückgrat um 1 C-Atom verlängert ist, genetisch fixiert zu sein. Allerdings existieren auch Publikationen, in welchen das Vorkommen von homo YTX neben YTX beschrieben wurde [186, 187].

SUZUKI *et al.* (2007) zeigten, dass Stämme von *P. reticulatum* neben YTX auch 45,46,47-trinor YTX, 1a-homo YTX, 45,46,47-trinor-1-homo YTX und 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxo YTX (noroxo YTX enone; keto YTX) enthielten. Die Konzentrationen dieser Analoga betrugen z.T. bis zu 50 % des Gehaltes der Gesamt-YTXs [187]. Während einer Studie in der eine Massenkultur eines neuseeländischen *P. reticulatum*-Stammes analysiert wurden, konnten mehr als 90 YTXs isoliert und identifiziert werden, darunter das 1,3-enone Isomer des heptanor-41-oxo YTX, 41a-homo YTX, 9-Me-41a-homo YTX, nor ring A YTX, polyhydroxylierte Amid-Analoga des YTX, 32-O diabinofuranosyl YTX, 45-hydroxy-46,47-dinor YTX, 44-oxo-45,46, 47-trinor YTX, 9-methyl-42,43,44,45,46,47,55-heptanor- 38-en-41-oxo YTX und viele andere mehr [29, 119, 121-123, 167].

Außerdem existieren weitere YTX-Analoga, von denen bisher nicht bekannt ist, ob sie durch die Dinoflagellaten produziert werden oder durch den Metabolismus in Schalentieren entstehen. So wurde lange Zeit vermutet, dass ATX erst in Muscheln entsteht, jedoch konnte kürzlich ein dem ATX ähnliches Analogon (ATX B) aus *P. reticulatum* isoliert werden (vgl. Kap. 1.2.5.1) [129].

Es wurde vermutet, dass auch die COOH- und OH-Derivate des YTX durch Metabolisierung in Schalentieren gebildet werden, jedoch konnten diese YTX-Analoga auch in verschiedenen Stämmen von *P. reticulatum* nachgewiesen werden [167, 186].

Das Toxinprofil von *P. reticulatum* unterscheidet sich, wie auch bei anderen Dinoflagellaten beobachtet, von Stamm zu Stamm, aber auch hinsichtlich des regionalen Ursprungs. So

wurde beispielsweise ATX bisher nur im Mittelmeer gefunden (vgl. Kap. 1.2.5.1 und 3) [188-190].

Deshalb wurden 18 *P. reticulatum*-Isolate unterschiedlicher Herkunft unter gleichen Bedingungen kultiviert, um zu überprüfen, ob charakteristische Unterschiede hinsichtlich der Bildung von YTXs bestehen (vgl. Kap. 6, S. 7, Tab. 1). Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass sich die YTX-Profile der untersuchten Kulturen unterscheiden (vgl. Kap. 6, S. 9, Tab. 3). Dabei war besonders auffällig, dass die Kulturen aus Japan generell eine ähnliche Zusammensetzung aufwiesen, auch wenn die prozentualen Anteile der YTX-Analoga sich z.T. unterschieden. Hauptsächlich wurden in diesen *P. reticulatum*-Stämmen neben YTX 32-O arabinofuranosyl YTX, 32-O diarabinofuranosyl YTX, keto YTX, nor ring A YTX, oxotrinor YTX, 45-OH YTX, 44,55 diOH YTX, 41a-homo YTX amide und einige weitere YTX-Analoga nachgewiesen. Zwei *P. reticulatum*-Stämme fielen durch einen besonders hohen Anteil an 32-O arabinofuranosyl YTX auf. Eine Maximalkonzentration an diesem YTX-Analogen von über 70 % wurde in den Stämmen CAWD 127 und U 10230 detektiert. In dem norwegischen Isolat U 10230 befand sich außerdem di-glykosiliertes YTX in relativ großen Mengen, während sich der Stamm aus der Deutschen Bucht besonders durch das Vorhandensein einiger YTXs mit Elimination von Teilen der ungesättigten Seitenkette auszeichnete. In *P. reticulatum* CCMP 3113 konnten neben den YTX-Analoga mit der Modifizierung an der ungesättigten Seitenkette einige Methyl-Varianten detektiert werden. Auch konnten in einigen Stämmen die bereits erwähnten OH- und COOH-Derivate des YTX und des homo YTX nachgewiesen werden (vgl. Kap. 6, S. 12, Fig. 6). Außerdem wurden in einigen Kulturen neben YTX auch Substanzen mit dem MG von homo YTX detektiert (vgl. Kap. 6, S. 9, Tab. 3). Es muss jedoch noch geprüft werden, ob es sich dabei um 1a-homo YTX oder 41a-homo YTX handelt.

Bisher ist nicht geklärt, in welchem Maße all diese YTXs von Schalentieren aufgenommen werden, jedoch werden die akkumulierten YTXs in Schalentieren weiter metabolisiert. Allerdings wurden lediglich für vier YTXs maximal zulässige Konzentrationen im Rahmen der EU-Verordnung (EG) Nr. 853/2002 festgelegt, denn es ist nur wenig über den Metabolismus von YTXs in Schalentieren, der zu einer weitaus höheren Anzahl von YTX-Analoga führt, bekannt (vgl. Kap. 1.4.2).

Die Detektion von YTXs mittels LC-MS/MS-Verfahren ist gut geeignet, um aus YTX gebildete Strukturvarianten zu identifizieren. Der spezifische Verlust des 80 amu großen Sulfatrestes

ist charakteristisch für viele YTX-Analoga. Zur eindeutigen Charakterisierung der vorerst nur dem YTXs zugeordneten aber bisher noch nicht sicher identifizierten Substanzen müssen jedoch immer noch weitere MS-Analysen mittels einer Ionenfalle erfolgen, denn damit können Produktions-Analysen (PI) mit n-facher Wiederholung ( $MS^n$ ) durchgeführt werden. Bereits bei Analysen mittels  $MS^3$  entstehen oft für YTXs spezifische Fragmente, welche die Identifikation von Strukturvarianten erleichtern, jedoch erlauben erst NMR-Experimente die Aufklärung der exakten Struktur von durch MS-Messungen nicht identifizierbaren YTXs (vgl. Kap. 1.3.4).

**Accumulation and metabolism of yessotoxin produced by *Protoceratium reticulatum* in Blue mussel (*Mytilus edulis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)**

Die Kontamination von Schalentierspezies mit YTX und dessen Analoga wurde 1987 von MURATA *et al.* erstmals erwähnt [25]. Damals wurde aufgrund des Auftretens DSP-ähnlicher Symptome im MBA angenommen, dass YTXs auch im menschlichen Organismus gleiche schwerwiegende Folgen verursachen wie die anderen Vertreter der DSP-Toxine. Deshalb wurden YTXs in die Gruppe der DSP-Toxine aufgenommen und maximal zulässige Höchstmengen für YTXs in Lebensmitteln wurden gesetzlich geregelt. Zunächst wurde ein Grenzwert von 160 µg YTXs/kg festgelegt. Bei toxikologischen Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass YTX oral aufgenommen eine wesentlich geringere Toxizität als i.p. appliziert, aufweist. Außerdem stellte man fest, dass YTX die Proteinphosphatasen 1 und 2A nicht inhibiert, wie es für die OA-Gruppe typisch ist (vgl. Kap. 1.2.6) [135]. Deshalb wurde der Grenzwert für die maximale YTX-Konzentration auf 1 mg/kg angehoben. Obwohl wenig über die Toxizität der einzelnen Analoga bekannt ist, wurden nur vier der über 90 YTXs gesetzlich geregelt: YTX, OH YTX, homo YTX und OH homo YTX (vgl. Kap. 1.4.2).

Seit der Entdeckung der YTXs erfolgte eine intensive Untersuchung der durch Dinoflagellaten produzierten und durch Schalentiere aufgenommenen und umgewandelten YTXs, jedoch nur wenige Studien beschreiben die Entgiftungsmechanismen in Schalentieren. Die verfügbaren Publikationen beschreiben hauptsächlich Feldstudien, darunter auch Studien über den Metabolismus von YTX in *M. edulis* [124, 191-194]. Allerdings existieren weder *in situ* noch *ex situ* Studien, die über den Metabolismus in *C. gigas* berichten. Da diese Spezies für die

deutsche Fischereiwirtschaft ebenfalls von großer Bedeutung ist, war es das Ziel dieser Studie, einen aus der Deutschen Bucht isolierten *P. reticulatum*-Stamm, dessen Toxinspektrum zu mehr als 94 % aus YTX besteht an *M. edulis* und *C. gigas* unter kontrollierten Bedingungen zu verfüttern, um herauszufinden welche YTX-Analoga hauptsächlich entstehen und wie diese in den Schalentieren abgebaut werden.

Die Ergebnisse bestätigten zunächst die Untersuchungen von AASEN *et al.* (2005). Es konnte gezeigt werden, dass YTX in *M. edulis* hauptsächlich zu 45-OH YTX, 45-OH COOH YTX und COOH YTX umgewandelt wird [191]. Diese YTX-Analoga konnten in *C. gigas* ebenfalls nachgewiesen werden, aber sie entstanden hier nach Fütterung mit dem gleichen *P. reticulatum*-Stamm nicht in gleichem Maße. Dies deutet auf einen im Vergleich zu *M. edulis* anderen Entgiftungsmechanismus in *C. gigas* hin.

Außerdem konnten in beiden Spezies zwei weitere YTXs (MW = 1048 Da und 1091 Da) nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich vermutlich um keto YTX (41-keto YTX (heptanor-41 oxo YTX), 40-epi 41-keto YTX (heptanor-41 oxo YTX) oder 41-keto YTX 1,3enone) mit MW=1048 Da (vgl. Kap. 1.2.5.1, Abb. 6, Tab. 5). Die exakte Struktur des anderen Analogon mit MW = 1091 Da konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Auffällig war jedoch, dass in *C. gigas* die Konzentration des vermutlichen keto YTX mit MW = 1047 Da während der Entgiftungsphase weiterhin anstieg. Dies deutet darauf hin, dass in *C. gigas* die Entstehung und der Verbleib dieses Analogons begünstigt sind.

Gerade hinsichtlich der Verkehrsfähigkeit von *C. gigas* ist dieses Ergebnis von Bedeutung, da bisher nicht bekannt war, dass *C. gigas* YTXs für längere Zeit akkumulieren kann. Auch muss in diesem Zusammenhang beachtet werden, dass die Toxizität der entstandenen YTXs bisher nicht bekannt ist. Allerdings existieren Studien, welche berichten, dass die Akkumulation des ECRA<sub>100</sub>-Fragmentes bei den YTX-Analoga mit einer verkürzten Seitenkette wesentlich geringer ist und auch die PDE-Aktivität weniger beeinflusst wird (vgl. Kap. 1.2.6 und 1.4.1) [121, 128, 129, 167]. Da keto YTXs durch diesen Verlust der Seitenkette charakterisiert sind, könnte dies mit einer Abnahme der Toxizität einhergehen. Allerdings sind die Ergebnisse der bisher bekannten Studien nicht eindeutig, und es fehlen abschließende toxikologische Untersuchungen.

Die in dieser Arbeit zusammengefaßten Publikationen zu den im Zusammenhang mit der Akkumulation und Metabolisierung von YTX in Schalentieren durchgeführten Experimenten lassen erkennen, dass auch bei Einsatz hochsensitiver LC-MS/MS-Methoden zur Bestimmung

der durch die EU-Verordnung (EG) Nr. 853/2004 geregelten YTX-Analoga fehlerhafte Ergebnisse im Hinblick auf die durch YTXs hervorgerufene Gesamttoxizität resultieren können. So müssen z.B. die Konzentrationen an dem bereits in mehreren Studien nachgewiesenen COOH YTX nicht bestimmt werden. Die Experimente mit *M. edulis* und *C. gigas* zeigten außerdem, dass nach der Aufnahme von YTX in Schalentieren weitere YTX-Analoga entstehen können, welche nicht geregelt sind. Unabhängig davon werden im Vergleich zu den funktionalen Assays (ELISA), welche auf der Antikörper-Bindung an bestimmten Regionen des Toxins beruhen, bei Einsatz von LC-MS/MS-Methoden nicht immer alle im Probenmaterial vorhandenen Toxine erfasst (vgl. Kap. 1.3.3). So zeigte sich in der Vergangenheit nach Auswertung von Analysendaten, dass mit ELISA-Methoden im Vergleich zu LC-MS/MS-Methoden 3-13 mal höhere YTX-Konzentrationen detektiert wurden [191, 195].

Dies soll jedoch nicht bedeuten, dass funktionale sowie biochemische Assays oder der MBA für die Testung der marinen Biotoxine die Methoden der Wahl sind, denn Proben natürlicher Herkunft können eine Vielzahl weiterer mariner Biotoxine enthalten. Deren Anwesenheit kann wegen der gemeinsamen Extraktion aus der Matrix im MBA oft zu falschen Ergebnissen führen, zumal durch Modifikationen der Extraktionsprozedur die Probleme nicht vollständig gelöst werden konnten (vgl. Kap. 1.3.1). Außerdem wäre eine Testung mittels verschiedener ELISA-Verfahren mit hohem zeitlichem Aufwand verbunden und eine Differenzierung zwischen den einzelnen YTXs wäre ebenfalls nicht möglich.

Somit werden in naher Zukunft LC-MS/MS-Methoden, welche eine möglichst große Anzahl der YTX-Analoga erfassen, an Bedeutung gewinnen, um die in den als Lebensmittel auf dem Markt befindlichen Schalentierspezies hinsichtlich mariner Biotoxine zu kontrollieren.

Es ist jedoch auch notwendig, die Toxizität der jeweiligen Biotoxine zu ermitteln, um TEFs zu etablieren. So ist z.B. bei den YTXs nur bekannt, dass die Toxizität mit Zunahme der Polarität der Seitenkette abnimmt, jedoch sind die von der EFSA publizierten TEFs als vorläufig deklariert und für einige erst kürzlich entdeckte YTXs konnten noch keine TEFs festgelegt werden (vgl. Kap. 1.2.6, 1.4.1 und 1.4.2). Diese Problematik wird besonders deutlich, wenn man die in dieser Arbeit publizierten Ergebnisse hinsichtlich des Vorkommens weiterer YTXs produziert von *P. reticulatum* unter diesem Aspekt betrachtet (vgl. Kap. 6).

## 9 Zusammenfassung

Bei der Lebensmittelerzeugung soll durch das Einhalten bestimmter Hygienevorschriften für den Verbraucher weltweit ein hohes Niveau des Gesundheitsschutzes gewährleistet werden. Dies ist für Lebensmittel tierischen Ursprungs, besonders für Fischereiprodukte, von großer Bedeutung, da diese besonders stark mikrobiellem Verderb ausgesetzt sind. Weniger bekannt ist jedoch, dass Lebensmittel mariner Herkunft auch mit marinen Biotoxinen kontaminiert sein können. Folglich ist für den Verbraucherschutz neben der Regelung bestimmter Prozessbedingungen, welche u.a. die Produktion, den Transport und die Lagerung betreffen, die Kontrolle auf Kontaminanten wie den marinen Biotoxinen in Fischereiprodukten, essentiell. In diesem Zusammenhang wurden durch die EU-Verordnung (EG) Nr. 853/2004 die maximal zulässigen Höchstmengen an Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)- und Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)-Toxine sowie an lipophilen marinen Biotoxinen (Okadasäure (OA), Dinophysistoxine (DTXs), Yessotoxine (YTXs), Pectenotoxine (PTXs) und Azaspirazide (AZAs)) durch Höchstmengen geregelt. Außerdem gilt für Tetrodotoxin (TTX) und Ciguatoxine (CTXs) ein generelles Einfuhrverbot für belastetes Material (vgl. Kap. 1.4.2). Dieses wird im Fall von TTX dadurch gewährleistet, dass bestimmte Spezies, welche ein hohes Risiko bzgl. einer TTX-Belastung darstellen, nicht eingeführt werden dürfen. Allerdings ist ein generelles Einfuhrverbot für möglicherweise mit CTXs kontaminierten Fische nicht möglich, da sehr viele - darunter besonders karnivore tropische - Fischarten CTXs sehr stark akkumulieren können. Durch die Zunahme von „Algenblüten“ („Harmful Algal Blooms“ HAB's) und die weltweit erhöhte Nachfrage nach tropischen Fischen wurde es notwendig, Analysenverfahren zu entwickeln, welche den schnellen, empfindlichen und vor allem eindeutigen Nachweis mariner Biotoxine ermöglichen. Unabhängig davon bleibt der Mausbioassay (MBA) das offizielle Untersuchungsverfahren zur Kontrolle von Seafood auf marine Biotoxine, auch wenn neben dem Tierversuch weitere Methoden zur Testung auf Biotoxine, d.h. auch zur Bestimmung der in dieser Arbeit besonders betrachteten marinen Biotoxinen angewandt werden.

In den letzten Jahren waren es vorrangig LC-MS/MS-basierte Methoden, die u.a. auch zum Nachweis und zur Strukturaufklärung mariner Biotoxine eingesetzt wurden. Folglich sollten LC-MS/MS-Methoden entwickelt werden, welche für die Analyse der Vorläufer-CTXs aus *Gambierdiscus* spp. und mit geringfügigen Modifikationen auch für die Detektion der



polareren CTXs aus Fischen einsetzbar sind. Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit eines CTX-Standards wurden die MS-Messungen zunächst mit den strukturähnlichen marinen Biotoxinen YTX und Brevetoxinen (BTXs) sowie mit einem Extrakt von *G. toxicus* durchgeführt. Nachfolgend konnten die LC-MS/MS Parameter so sehr optimiert werden, dass eine geeignete SIM- sowie eine MRM-Methode zum Nachweis von CTXs eingeführt werden konnte. Durch die anschließende Analyse des Toxinprofils verschiedener Spezies der Gattung *Gambierdiscus* konnte gezeigt werden, dass sich die aus verschiedenen Regionen stammenden Stämme hinsichtlich ihres Toxinprofils charakteristisch unterscheiden und, dass die Produktion von CTXs durch die Veränderung der Salinität modifiziert werden kann (vgl. Kap. 3).

Die Untersuchung der Bildung von YTXs ist ebenfalls von großer Bedeutung für die Lebensmittelüberwachung. Auch wenn die Toxizität der YTXs im Vergleich zu den anderen DSP-Toxinen relativ gering ist, bleibt es weiterhin notwendig zu untersuchen, welche YTX-Analoga vom Phytoplankton gebildet und welche davon von Schalentieren akkumuliert und metabolisiert werden.

Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, aus welchen Gründen marine Biotoxine von Dinoflagellaten gebildet werden. Es wird u.a. vermutet, dass die Produktion der Toxine als Ergebnis der Evolution einen Überlebensvorteil darstellt [196]. Die Veränderung des Klimas sowie der Nährstoffverfügbarkeit in küstennahen Gebieten scheinen Ursache vermehrter Blüten toxischen Phytoplanktons zu sein [8]. Teilweise ist die Produktion der Toxine zwar genetisch determiniert, jedoch haben Kultivierungsbedingungen einen großen Einfluss auf das Wachstum der Algen sowie die gebildete Toxin-Menge [186, 187]. Da bisherige Untersuchungen keine eindeutigen Ergebnisse bzgl. des Einflusses dieser Bedingungen auf die Toxinproduktion von *P. reticulatum* ergaben und betreffende Aussagen von Bedeutung für Risikoeinschätzungen sind, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, wie sich Veränderungen der ökologischen Parameter auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *P. reticulatum* auswirken. In Auswertung der durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass steigende Temperaturen die Wahrscheinlichkeit für eine Blüte des in der Nordsee endemischen Dinoflagellaten nicht erhöhen würden. Die Produktion von YTX durch den Dinoflagellaten *P. reticulatum* scheint vielmehr direkt mit dem Lebenszyklus und der Teilungsrate zusammenzuhängen. Außerdem zeigte sich, dass eine P-Limitierung bei dieser Spezies zu hohen Toxinkonzentrationen pro Zelle führt. Durch die Analyse der Morphologie

dieses Dinoflagellaten konnte gezeigt werden, dass der Eintritt in die stationäre Phase mit dem Anstieg der Toxizität in engem Zusammenhang steht. Diese Ergebnisse wurden durch eine zweite Studie belegt, in welcher zusätzlich zu dem Isolat aus der Nordsee Spezies aus Japan und den USA untersucht wurden. In Verbindung mit der aufgestellten Hypothese, dass der Eintritt in die stationäre Phase bei den P-limitierten *P. reticulatum*-Kulturen zunächst lediglich zu einem Teilungsstopp der Kulturen ohne direkten Zelltod führt, kann geschlussfolgert werden, dass die Produktion der YTXs nicht durch die äußeren Einflüsse eingeschaltet wird, sondern in diesem Fall durch einen fortschreitenden Metabolismus in den Zellen bewirkt wird. Weiterhin konnte der Nachweis erbracht werden, dass die extrazelluläre Konzentration des YTX in der stationären Phase mit einer Zunahme des Zelltodes einhergeht und offensichtlich nicht durch eine gesteigerte Abgabe von YTX in das Kulturmedium verursacht wird (vgl. Kap. 4 und 5).

Seit der Identifizierung von YTX wurden diverse YTX-Analoga im Phytoplankton und in Schalentieren detektiert, deren exakte Strukturen erst teilweise aufgeklärt werden konnten. Zunächst nahm man an, dass diese Analoga hauptsächlich durch Metabolisierung in Schalentieren entstehen. Mit der Entwicklung und dem Einsatz LC-MS/MS-basierter Methoden zum Nachweis einzelner mariner Biotoxine und ihrer Strukturvarianten gelang es jedoch, diverse YTXs bereits im Phytoplankton nachzuweisen. Durch die Analyse von 18 *P. reticulatum*-Stämmen aus Japan, Neuseeland, Australien, den USA, Norwegen und Deutschland auf mehr als 20 YTX-Analoga konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Bildung der YTXs zwar vom Ursprungsort der Dinoflagellaten abhängt, jedoch im wesentlichen die gleichen YTXs produziert werden. Auch die detektierten Strukturvarianten der homo YTX-Reihe waren durch das Vorhandensein der YTX-Analoga mit typischen Modifikationen an der ungesättigten Seitenkette charakterisiert. Es wurden jedoch von einigen Stämmen charakteristische Toxine wie nor ring A YTX, methylierte YTXs oder die Amid-Analoga produziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die YTX-Analoga einen beträchtlichen Anteil ausmachen können. Der Anteil von 32-O-arbinofuranosyl YTX, dessen Toxizität und Metabolismus bisher wenig untersucht ist, betrug bis zu 70 % des Gehaltes an Gesamt-YTXs (vgl. Kap. 6).

Die gesetzlichen Regelungen im Hinblick auf YTXs sind in der EU-Verordnung (EG) Nr. 853/2004 aufgeführt. Als Standard-Methode wurde auch weiterhin der MBA vorgeschrieben, jedoch können weitere Verfahren wie funktionale und biochemische Tests

sowie LC-MS/MS-Methoden ersatzweise oder zusätzlich angewandt werden. Diese Regelung wurde aufgrund der Schwierigkeiten eingeführt, welche sich aus den Nachteilen der einzelnen Analysenverfahren ergab. So ist vor allem die Anwendung des MBA neben der fehlenden Spezifität mit weiteren Nachteilen verbunden (vgl. Kap. 1.3).

Wegen der unterschiedlichen Toxizität der lipophilen marinen Biotoxine treten besonders im MBA nach der Extraktion, die zum Vorliegen aller lipophilen Substanzen im Rohextrakt führt, große Schwierigkeiten auf. Durch massenspektrometrische Verfahren kann bei Vorhandensein entsprechender Standardsubstanzen und genauerer Kenntnis bzgl. der Toxizität rechtlich relevanter Toxin-Analoga ein wirksamer Verbraucherschutz gewährleistet werden. Vor allem hinsichtlich der vielen Strukturvarianten von YTX spielt dies eine Rolle. Derzeit sind lediglich vier der über 90 YTX-Analoga lebensmittelrechtlich geregelt, obwohl wenig über die Wirkungsweise und die Toxizität der anderen Strukturvarianten bekannt ist. Deshalb ist es notwendig zu untersuchen, ob – und wenn ja welche – YTX-Analoga durch Schalentiere vorrangig angereichert werden. Es zeigte sich, dass sowohl *M. edulis* als auch *C. gigas* YTXs akkumulieren. Der bereits publizierte Metabolismus von YTX durch *M. edulis* zu 45-OH YTX, COOH YTX und 45-OH COOH YTX konnte bestätigt und ergänzt werden, denn es gelang der Nachweis von zwei weiteren YTX-Analoga. In *C. gigas* konnten ebenfalls die OH- und COOH-Derivate detektiert werden, diese wurden jedoch nach der Beendigung der Toxin-Exposition relativ schnell abgebaut. *C. gigas* zeichnete sich aber überraschenderweise durch eine starke Akkumulation von keto YTX aus (vgl. Kap. 7).

Bisher ist nur wenig über die Toxizität der Strukturvarianten bekannt. Allerdings wird vermutet, dass die Verkürzung der Seitenkette zu einer Erniedrigung der Toxizität führt. Die derzeitige Überarbeitung der gesetzlichen Regelungen für marine Biotoxine ist folglich von großer Bedeutung, und es sollten, neben den bereits gesetzlich geregelten auch andere, häufig vorkommende YTX-Analoga einbezogen werden. Dadurch könnten wahrscheinlich auch die bestehenden Diskrepanzen zwischen biochemischen Tests (ELISA) und der Detektion mittels MS eingegrenzt werden. Außerdem sollten Toxizitätsäquivalenz-Faktoren (TEF's) für häufig vorkommende YTXs etabliert werden, wie es für die Strukturvarianten anderer Toxingruppen bereits üblich ist.

## Summary

Within the food branch it is essential to guarantee high hygienically standards to assure a high level of protection for the public health. This, applies to all kinds of food of animal origin and especially to seafood, because those tend to present a frequently hazard for the contamination with microbiological contaminants. Beside specific conditions concerning any stage of production, processing and distribution of food, the detection of the respective contaminants, like the fewer known marine biotoxins in seafood, is essential to protect the consumer. Therefore, the EU-regulation (EC) No. 853/2004, includes maximum levels for amnesic shellfish poisoning (ASP)-, paralytic shellfish poisoning (PSP)- toxins and lipophilic marine biotoxins (okadaic acid (OA), dinophysistoxins (DTXs), yessotoxins (YTXs), pectenotoxins (PTXs), and azaspiracids (AZAs)). In general, it is essential that food containing tetrodotoxin (TTX) and ciguatoxins (CTXs) must not be placed on the market (see Chapt. 1.4.2). More precisely, this means that specific species that are likely to be contaminated with TTX have to be excluded from any form of import. However, the prohibition of imports of CTXs-contaminated species is generally not possible, due to the fact that many species, mostly tropical carnivorous fish, are able to accumulate large amounts of CTXs for a particular amount of time.

The increase of the risk for harmful algal bloom's (HABs) and the worldwide increasing demand for tropical fish require the development of reliable methods that are able to detect and analyse these toxins. The suggested standard method is the MBA and other tests, like functional and biochemical assays, could be applied alternatively or in addition, also for the detection of biotoxins discussed within this thesis.

Therefore, the aim of this thesis was to develop and provide LC-MS/MS- methods for the detection of the precursor CTXs from *Gambierdiscus* spp. and, with little modifications, also methods for the detection of the more polar CTXs from fish. Due to a lack of available CTX standard material, structurally related marine biotoxins YTXs and brevetoxins (BTXs) and crude extracts of *Gambierdiscus toxicus* were used to develop these methods. Subsequently, the LC-MS/MS-parameters were adjusted to implement suitable SIM- and MRM-methods.

Also the successive analysis of different species of the genus *Gambierdiscus* showed differences of the toxin pattern in dependence to the origin of the CTX producer.

Furthermore, the production of the CTXs by *G. toxicus* was modified by the salinity of the culture media (see Chapt. 3).

In addition, the thesis concentrates on the analysis of the YTXs which plays a significant role for food monitoring. Because even if the toxicity seems to be smaller than initially assumed it is necessary to investigate which YTXs were produced by the phytoplankton and metabolized by the shellfish species.

So far also the prediction of potential effects of an YTX exposition is currently not possible. Moreover, the reasons for the production of marine biotoxins by dinoflagellates are not yet solved. Among others, it seems that the formation results out of evolutionary viability advantages of the organisms [196]. Also climate change and eutrophication in offshore areas may cause the increase of HAB's [8].

The production of toxins seems to be partially genetically determined, but conditions of cultivation could also have a great influence on growth and formation of the toxins [186, 187]. As there have been no definite answers about what causes the YTXs formation of *P. reticulatum*, another aim of this thesis has been to investigate how modifications of autecologic factors may change the growth and toxin formation of *P. reticulatum*, because mentioned factors are relevant for assessing potential risks. It was showed that changes of the climate with their influence on the increasing of the temperature of the North Sea will not lead to a higher risk for a bloom of this endemic dinoflagellate. The production of YTX by *P. reticulatum* seems to correlate directly with the life cycle and the division rate. Furthermore, results have shown that P-limitation would lead to high YTX cell quotas. The analyses of the morphology of the cells have furthermore shown that the entry into the stationary phase, without a dieback of the cells, is connected with an increase of the YTX cell quota. These results were supported by additional investigations of *P. reticulatum* species from Japan and the USA. One can therefore assume that the entry into the stationary phase of the P-limited cultures primarily causes the stop of the cell division without a dieback of the cells and is, in this case, not affected by extrinsic factors but rather caused by an ongoing metabolism in *P. reticulatum* cells. Moreover, it could be demonstrated that the proceeded dieback of the cells during the stationary phase is accompanied by an increase of the extracellular YTX concentration in the culture medium and is consequently, not caused by an enhanced release by the cells (see Chapt. 4 und 5).

Since the detection of YTX, many analogues were detected in the phytoplankton and mollusks. It was possible that their chemical structures could be characterized to some extent. Initially, it was suggested that the YTX analogues were primarily produced by the metabolism in the shellfish species but via the development of sensitive analytical methods which were able to focus on the produced congeners, many YTXs could be identified in the dinoflagellates of the recent past. Moreover, the analysis of more than 20 YTXs in 18 *P. reticulatum* isolates coming from Japan, New Zealand, Australia, the USA, Norway, and Germany was able to proof that the production of the YTXs depends on the origin of the culture as well. The main part of the analogues is more or less similar; also the homo YTXs were characterized by the presence of the analogues with typical modifications at the unsaturated side chain. But some isolates formed original analogues, like nor ring A YTX, methylated YTXs, and amide YTXs. Furthermore, it could be demonstrated, that the YTX analogues can represent a considerable amount of the total YTXs concentration. Especially, the 32-O arabinofuranosyl YTX represented up to 70 % of the total YTX concentration; and the toxicity and metabolism of this analogue is insufficiently investigated (see Chapt. 6).

Several tests were recommended as analytical methods in the regulation (EC) No. 853/2004 for the analysis of YTXs. The suggested standard method is still the MBA but other tests, like functional and biochemical assays, could be applied alternatively or in addition. This ambiguous regulation did arise due to analytical difficulties caused by the disadvantages of the respective methods. For instance, the results of the MBA method can, beside other disadvantages, not be quantificated (see Chapt. 1.3).

Especially, the toxicological disparity between lipophilic marine biotoxins and the co-extraction caused a lot of analytical problems. Therefore, research for new analytical methods, which allow the reliable detection of marine biotoxins, has been ongoing in the recent past. Massspectrometrical methods can if they include suitable standard substances and a clarified toxicity of most of the YTXs, assure the costumer security requisitions. Currently, only four out of more than 90 YTX analogues are regulated by the EU, although less is known about their operating and toxicity. Therefore, it is necessary to identify, which analogues were formed and enriched by metabolism in the shellfish tissue.

It was possible to show that both, *M. edulis* and *C. gigas* accumulate YTXs. The known metabolism of YTX by *M. edulis* to 45-OH YTX, COOH YTX, and 45-OH COOH YTX could be supplemented and two further YTXs could be detected. OH- and COOH-derivates could be

detected in *C. gigas* as well. But those analogues were degraded relatively fast, when the YTX exposition stopped. *C. gigas* surprisingly demonstrated a distinguished accumulation of the, also in *M. edulis* detected, keto YTX (see Chapt. 7).

So far, only little is known about the toxicity of the YTX congeners, although it is assumed that the shorter side chain is accompanied by the loss of toxicity. It is therefore not only important, to revise current analytical methods but also to include prevalent analogues which are often comprised during the LC-MS/MS analyses. By this one could then probably also narrow existing discrepancies between biochemical tests (ELISA) and detections with LC-MS/MS methods. Furthermore, toxicity equivalent factors (TEF's), which are already established for many other marine biotoxins, should be established for frequently occurring YTXs.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Rigby, G., Hallegraeff, G., 1996. Ballast water controls to minimize the translocation and establishment of toxic marine phytoplankton - What progress we made and where are we going? Eds. Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y., Paris, IOC/UNESCO In: Harmful and toxic algal blooms: 201-204.
2. Williams, R.J., Griffiths, F. B., Van der Wal, E. J., Kelly, J., 1988. Cargo vessel ballast water as a vector for the transport of non-indigenous marine species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 26: 409-420.
3. David, M., Perkovic, M., 2004. Ballast water sampling as a critical component of biological invasions risk management. *Marine Pollution Bulletin*, 49: 313-318.
4. Burkholder, J.M., Hallegraeff, G.M., Melia, G., Cohen, A., Bowers, H.A., Oldach, D.W., Parrow, M.W., Sullivan, M. , Zimba, P.V., Allen, E.H., Kinder, C.A., Mallin, M.A., 2007. Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of U.S. military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices. *Harmful Algae*, 6: 486-518.
5. Nehring, S., Klingenstein, F., 2008. Aquatic alien species in Germany – Listing system and options for action, in *Biological invasions – from ecology to conservation.*, Eds. Rabitsch, W., Essl, F., Klingenstein, F., NEOBIOTA: 19-33.
6. Gollasch, G., Nehring, N., 2006. National checklist for aquatic alien species in Germany. *Aquatic Invasions*, 1: 245-269.
7. Reise, K., Gollasch, S., Wolff, W.J., 2002- Introduced marine species of the North Sea coasts. Eds. Leppäkoski, E., Gollasch, S., Olenin, S., Kluwer: Dordrecht. In: *Invasive aquatic species of Europe - Distribution, impacts and management*: 260-266.
8. Anderson, D., Glibert, P., Burkholder, J., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries and Coasts*, 25: 704-726.
9. Moestrup, Ø.E., IOC Taxonomic Reference List of Toxic Algae, 2004. In: [ioc.unesco.org/hab/data.htm](http://ioc.unesco.org/hab/data.htm). 2004., Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (IOC).
10. <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=109394>.
11. <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=231798>.
12. <http://botany.si.edu/references/dinoflag/Taxa/Gtoxicus.htm>.
13. Satake, M., MacKenzie, L., Yasumoto, T., 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Natural Toxins*, 5: 164-167.
14. Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R., Yasumoto, T., 1998. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic Sea. Vigo: Xunta de Galicia and IOC/UNESCO.
15. Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C., Poletti, R., Milandri, A., Ceredi, A., Pompei, M., 1999. High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon*, 37: 1187-1193.
16. Rhodes, L., McNabb, P., De Salas, M., Briggs, L., Beuzenberg, V., Gladstone, M., 2006. Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae*, 5: 148-155.



17. Riccardi, M., Riccardi, M., Guerrini, F., Roncarati, F., Milandri, A., Cangini, M., Pigozzi, S., Riccardi, E., Ceredi, A., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Pistocchi, R., 2009. *Gonyaulax spinifera* from the Adriatic Sea: Toxin production and phylogenetic analysis. *Harmful Algae*, 8: 279-290.
18. Paz, B., Daranas, A., Norte, M., Rioba, P., Franco, J., Fernandez, J., 2008. Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Marine Drugs*, 6: 73-102.
19. Hampson, D.R., Huie, D., Wenthold, R.J., 1987. Solubilization of kainic acid binding sites from rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 49: 1209-1215.
20. FAO/WHO/IOC, Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs, 2004. Oslo.
21. Luckas, B., Erler, K., Gerdt, G., Wasmund, N., Hummert, C., Hansen, P. D., 2005. Overview of key phytoplankton toxins and their recent occurrence in the North and Baltic Seas. *Environmental Toxicology*, 20: 1-17.
22. Marine Biotoxins: FAO Food and Nutrition Paper. Vol. 80. 2004, Rome: Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
23. Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D., 1995. Manual on harmful marine microalgae. IOC Manual and Guides. Paris: IOC-UNESCO.
24. Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., Poletti, R., 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon*, 34: 923-935.
25. Murata, M., Kumagai, M., Lee, J.S., Yasumoto, T., 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters*, 28: 5869-5872.
26. EC, Commission decision of 15 March 2002 laying down detailed rules for the implementation of Council Directive 91/492/EEC as regards the maximum levels and the methods of analysis of certain marine biotoxins in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods. 2002, Official Journal of the European Communities. p. 62-64.
27. Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H., Landsverk, T., 2002. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxins towards mice. *Toxicon*, 40: 77-82.
28. Alexander, J., Benford, D., Boobis, A., Ceccatelli, S., Cravedi, J.-P., Di Domenico, A., Doerge, D., Dogliotti, E., Edler, L., Farmer, P., Filipič, M., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., Guerin, T., Knutsen, H.K., Machala, M., Mutti, A., Schlatter, J., van Leeuwen, R., Verger, P., 2009. Marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins, Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal*, 1306: 1-23.
29. Miles, C.O., Samdal, I.A., Aasen, J.A.G., Jensen, D.J., Quilliam, M.A., Petersen, D., Briggs, L.M., Wilkins, A.L., Rise, F., Cooney, J.M., MacKenzie, L.A., 2005. Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*, 4: 1075-1091.
30. Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G. K., Clardy, J., 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41: 1019-1025.
31. Shumway, S.E., 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 21: 65-104.

32. De la Rosa, L.A., Alfonso, A., Vilarino, N., Vieytes, M.R., Botana, L. M., 2001. Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochemical Pharmacology*, 61: 827-833.
33. Perez-Gomez, A., Ferrero-Gutierrez, A., Novelli, A., Franco, J.M., Paz, B., 2006. Potent neurotoxic action of the shellfish biotoxin yessotoxin on cultured cerebellar neurons. *Toxicological Science*, 90: 168-177.
34. Miles, C.O., 2007. Pectenotoxins, in *Phycotoxins - Chemistry and biochemistry*. Ed. L. Botana, Blackwell Publishing: Oxford. 159-186.
35. Nicolaou, K.C., Koftis, T.V., Vyskocil, S., Petrovic, G., Ling, T., Yamada, Y.M.A., Tang, W., Frederick, M.O., 2004. Structural revision and total synthesis of azaspiracid-1, Part 2: definition of the ABCD domain and total synthesis. *Angewandte Chemie* 116: 4418 – 4424.
36. Nicolaou, K.C., Koftis, T.V., Vyskocil, S., Petrovic, G., Tang, W.J., Frederick, M.O., Chen, D.Y.K., Li, Y.W., Ling, T.T., Yamada, Y.M.A., 2006. Final assignment and total synthesis of the correct structure of azaspiracid-1. *JACS*, 128: 2859-2872.
37. James, K.J., Diaz, S.M., Lehane, M., Bran, A., Furey, A., 2002. First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon*, 40: 909-915.
38. James, K., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M., Furey, 2003. A. Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon*, 41: 145-151.
39. Krock, B., Tillmann, U., John, U., Cembella, A.D., 2009. Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae*, 8: 254-263.
40. Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A.D., 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology*, 44: 63-79.
41. Twiner, M., Rehmann, N., Hess, P., Doucette, G., 2008. Azaspiracid shellfish poisoning: A review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Marine Drugs*, 6: 39-72.
42. Alfonso, A., Román, Y., Vieytes, M.R., Ofuji, K., Satake, M., Yasumoto, T., Botana, L.M., 2005. Azaspiracid-4 inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  entry by stored operated channels in human T lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 69: 1627-1636.
43. Vale, C., Nicolaou, K.C., O. Frederick, M., Gomez-Limia, B., Alfonso, A., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2007. Effects of azaspiracid-1, a potent cytotoxic agent, on primary neuronal cultures. A structure-activity relationship study. *Journal of Medical Chemistry*, 50: 356-363.
44. Luckas, B., 1992. Phycotoxins in seafood - toxicological and chromatographic aspects. *Journal of Chromatography*, 624: 439-456.
45. Botana, L., 2007. *Phycotoxins - Chemistry and biochemistry*. Vol. 1., Oxford: Blackwell Publishing.
46. Christian, B., Luckas, B., 2008. Determination of marine biotoxins relevant for regulations: The long way from the mouse bioassay to coupling LC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391: 117-134.

47. Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T., 1998. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. JACS, 120: 9967-9968.
48. Vilarino, N., 2007. Biochemistry of azaspiracid poisoning toxins, in Phycotoxins: Chemistry and biochemistry, Ed. Botana, L.M., Blackwell Publishing: Iowa. 311-318.
49. Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R., Adachi, R., 1977. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 43: 1021-1026
50. Kohler, S., Kohler, C., 1992. Dead bleached coral provides new surfaces for dinoflagellates implicated in ciguatera fish poisonings. Environmental Biology of Fishes, 35: 413-416.
51. Simon, H., Phil, W., Alistair, W., 1999. Ciguatera (fish poisoning), El Niño, and Pacific Sea surface temperatures. Ecosystem Health, 5: 20-25.
52. Fleming, L., Dewailly, E., Baden, D.G., 2001. The epidemiologic of marine algal blooms. Epidemiology, 11: 143.
53. Lewis, R.J., 2001. The changing face of ciguatera. Toxicon, 39: 97-106.
54. Lehan, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. International Journal of Food Microbiology, 61: 91-125.
55. Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., 1993. Gambierol: A new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. JACS, 115: 361-362.
56. Nicholson, G.M., Lewis, R.J., 2006. Ciguatoxins: Cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. Marine Drugs, 4: 82-118.
57. Murata, M., Naoki, H., Iwashita, T., Matsunaga, S., Sasaki, M., Yokoyama, A., Yasumoto, T., 1993. Structure of maitotoxin. JACS, 115: 2060-2062.
58. Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., 1993. The structure of CTX-3C, a ciguatoxin congener isolated from cultured *Gambierdiscus toxicus*. Tetrahedron Letters, 34: 1975-1978.
59. Lewis, R.J., Jones, A., Vernoux, J.-P., 1999. HPLC/tandem electrospray mass spectrometry for the determination of sub-ppb levels of Pacific and Caribbean ciguatoxins in crude extracts of fish. Analytical Chemistry, 71: 247-250.
60. Lewis, R.J., Jones, A., Vernoux, J.-P., Marquais, M., 1998. Sensitive detection of multiple ciguatoxins by HPLC/MS/MS. Vigo: Xunta de Galicia and IOC/UNESCO.
61. Nagai, H., Mikami, Y., Yasumoto, T., 1995. Antifungals produced by dinoflagellates -- gambieric acids. Pesticide Science, 44: 92-94.
62. Nagai, H., Murata, M., Torigoe, K., Satake, M., Yasumoto, T., 1992. Gambieric acids, new potent antifungal substances with unprecedented polyether structures from a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. Journal of Organic Chemistry, 57: 5448-5453.
63. Nagai, H., Torigoe, K., Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., Hirota, H., 1992. Gambieric acids: unprecedented potent antifungal substances isolated from cultures of a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. JACS, 114: 1102-1103.
64. Lekan, D.K., Tomas, C.R., 2009. The brevetoxin and brevenal composition of three *Karenia brevis* clones at different salinities and nutrient conditions. Harmful Algae, 9: 39-47.

- 
65. Scheuer, P.J., Takahashi, W., Tsutsumi, J., Yoshida, T., 1967. Ciguatera: isolation and chemical nature. *Science*, 1967. 155: p. 1267-1268.
  66. Tachibana, K., et al., Recent developments in the molecular structure of ciguatoxin. *Biological Bulletin*, 172: 122-127.
  67. Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y., Fukui, M., Yasumoto, T. 1990. Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *JACS*, 112: 4380-4386.
  68. Holmes, M.J., Lewis, R.J., Poli, M.A., Gillespie, N.C., 1991. Strain dependent production of ciguatoxin precursors (gambiertoxins) by *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon*, 29: 761-75.
  69. Bienfang, P., Oben, B., DeFelice, S., Moeller, P., Huncik, K., Oben, P., Toonen, R., Daly-Engel, T., Bowen, B., 2008. Ciguatera: the detection of neurotoxins in carnivorous reef fish from the coast of Cameroon, West Africa. *African Journal of Marine Science*, 30: 533-540.
  70. Dickey, R.W., Plakas, S.M., 2010. Ciguatera: A public health perspective. *Toxicon*, 2009. In Press, Corrected Proof.
  71. Villareal, T.A., Hanson, S., Qualia, S., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Dickey, R.W., 2007. Petroleum production platforms as sites for the expansion of ciguatera in the northwestern Gulf of Mexico. *Harmful Algae*, 6: 253-259.
  72. Agligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G., 2009. Toxic benthic dinoflagellates spreading and potential risk in the Mediterranean Sea. In: 7th International Conference on molluscan shellfish safety, Conference Handbook. Nantes, France
  73. Aligizaki, K., Nikolaidis, G., Fraga, S., 2008. Is *Gambierdiscus* expanding to new areas? *Harmful Algae News* 2008. 36: 6-7.
  74. Kirkpatrick, B., Fleming, L.E., Squicciarini, D., Backer, L.C., Clark, R., Abraham, W., Benson, J., Cheng, Y.S., Johnson, D., Pierce, R., Zaias, J., Bossart, G.D., Baden, D.G., 2004. Literature review of Florida red tide: implications for human health effects. *Harmful Algae*, 3: 99-115.
  75. Davis, C.C., 1948. *Gymnodinium brevis* sp. nov., a cause of discolored water and animal mortality in the Gulf of Mexico. *Botanical Gazette*, 109: 358-360.
  76. Baden, D.G., 1988. Public health problems of red tides. In: *Marine toxins and venoms*, Ed. Tu, A.T., Marcell Dekker, Inc.: NY. 259-277.
  77. Baden, D.G., 1989. Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins. *FASEB J.*, 3: 1807-1817.
  78. Lin, Y.Y., Risk, M., Ray, S.M., Van Engen, D., Clardy, J., Golik, J., James, J.C., 1981. Isolation and structure of brevetoxin B from the "red tide" dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*). *JACS*, 103: 6773-6775.
  79. Baden, D.G., Bourdelais, Andrea J., Jacocks, H., Michelliza, S., Naar, J., 2005. Natural and derivative brevetoxins: Historical background, multiplicity, and effects. *Environmental Health Perspectives*, 113: 621-625.
  80. Luckas, B., Günzler, H., 1994. Vorkommen und Analytik von Algentoxinen, in *Analytikertschenbuch*. Ed. Günzler, H.B., Danzer, K., Engewald, W., Fresenius, W., Galensa, R., Huber, W., Linscheid, M., Schwedt, G., Tölg, G., Springer: Berlin Heidelberg New York. p. 215–250.

81. Kirkpatrick, B., Bean, J.A., Fleming, L.E., Kirkpatrick, G., Grief, L., Nierenberg, K., Reich, A., Watkins, S., Naar, J., 2010- Gastrointestinal emergency room admissions and Florida red tide blooms. *Harmful Algae*, 9: 82-86.
82. Poli, M.A., Mende, T.J., Baden, D.G., 1986. Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes. *Molecular Pharmacology*, 30: 129-35.
83. Rein, K.S., Baden, D.G., Gawley, R.E., 1994. Conformational analysis of the sodium channel modulator, brevetoxin A, comparison with brevetoxin B conformations, and a hypothesis about the common pharmacophore of the "site 5" toxins. *Journal of Organic Chemistry*, 59: 2101-2106.
84. Trainer, V.L., Baden, D.G., Catterall, W.A., 1994. Identification of peptide components of the brevetoxin receptor site of rat brain sodium channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 31: 19904-19909.
85. Wang, S.-Y., Wang, G.K., 2003. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cellular Signalling*, 15: 151-159.
86. Cameron, J., Flowers, A.E., Capra, M.F., 1991. Electrophysiological studies on ciguatera poisoning in man (Part II). *Journal of the Neurological Sciences*, 101: 93-97.
87. Cameron, J., Flowers, A.E., Capra, M.F., 1991. Effects of ciguatoxin on nerve excitability in rats (Part I). *Journal of the Neurological Sciences*, 101: 87-92.
88. Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X.D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., Numa, S., 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339: 597-603.
89. Furey, A., García, J., O'Callaghan, K., Lehane, M., Fernández Amandi, M., James, K.J. 2007. Brevetoxins: structure, toxicology, and origin. In: *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry*, Ed. Botana, L.M., Blackwell Publishing: Iowa. 19-46.
90. Mattei, C., García, J., O'Callaghan, K., Lehane, M., Fernández Amandi, M., James, K.J., 1999. Neurotoxins targetting receptor cite 5 of voltage-dependent sodium channels increase the nodal volume of myelinated axons. *Journal of Neuroscience Research*, 55: 666-673.
91. Jeglitsch, G., Rein, K., Baden, D. G., Adams, D. J., 1998. Brevetoxin-3 (PbTx-3) and its derivatives modulate single tetrodotoxin-sensitive sodium channels in rat sensory neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284: 516-525.
92. Lewis, R.J., 2006. Ciguatera: Australian perspectives on a global problem. *Toxicon*, 48: 1-11.
93. Lehane, L., 1999. Ciguatera Fish Poisoning a review in a risk-assessment framework.
94. Wang, D.-Z., 2008. Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review. *Marine Drugs*, 6: 349-371.
95. Ghiaroni, V., Fuwa, H., Inoue, M., Sasaki, M., Miyazaki, K., Hiramata, M., Yasumoto, T., Rossini, G.P., Scalera, G., Bigiani, A., 2006. Effect of ciguatoxin 3C on voltage-gated Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents in mouse taste cells. *Chemical Senses*, 31: 673-680.
96. Murata, M., Yasumoto, T., 2000. The structure elucidation and biological activities of high molecular weight algal toxins: maitotoxin, prymnesins and zooxanthellatoxins. *Natural Products Report*, 17: 293-314.

97. Kakizaki, A., Takahashi, M., Akagi, H., Tachikawa, E., Yamamoto, T., Taira, E., Yamakuni, T., Ohizumi, Y., 2006.  $\text{Ca}^{2+}$  channel activating action of maitotoxin in cultured brainstem neurons. *European Journal of Pharmacology*, 536: 223-231.
98. LePage, K.T., Rainier, J. D., Johnson, H.W.B., Baden, D.G., Murray, T.F., 2007. Gambierol acts as a functional antagonist of neurotoxin site 5 on voltage-gated sodium channels in cerebellar granule neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323: 174-179.
99. LePage, K.T., D.G. Baden, Murray, T.F., 2003. Brevetoxin derivatives act as partial agonists at neurotoxin site 5 on the voltage-gated  $\text{Na}^+$  channel. *Brain Research*, 959: 120-127.
100. Pierce, R.H., Henry, M.S., Blum, P.C., Hamel, S.L., Kirkpatrick, B., Cheng, Y.S., Zhou, Y., Irvin, C.M., Naar, J., Weidner, A., Fleming, L.E., Backer, L.C., Baden, D.G., 2005. Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins. *Harmful Algae*, 4: 965-972.
101. Sagir Ahmed, , O. Arakawa, M.D., Onoue, Y., 1995. Toxicity of cultured *Chatonella marina*. In: *Harmful Marine Algal Blooms*, Ed. Lassus, P., Lavoisier: Paris. 499-504.
102. Khan, S., Arakawa, O., Onoue, Y., 1997. Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan. *Aquaculture Research*, 28: 9-14.
103. Bourdelais, A.J., Campbell, S., Jacocks, H., Naar, J., Wright, J.L.C., Carsi, J., Baden, D.G., 2004. Brevenal is a natural inhibitor of brevetoxin action in sodium channel receptor binding assays. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 24: 553-563.
104. Kao, C.Y., Walkwe, S.E., 1982. Active groups of saxitoxin and tetrodotoxin as deduced from action of saxitoxin analogues on frog muscle and squid axon. *Journal of Physiology*, 323: 619-637.
105. 107. Bricelj, V.M., Connel, L., Konoki, K., Macquarrie, S.P., Scheuer, T., Catterall, W.A., Trainer, V.L., 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increase risk of PSP. *Nature*, 434: 763-767.
106. Alexander, J., Benford, D., Cockburn, A., Cravedi, J.-P., Dogliotti, E., Di Domenico, A., Fernández-Cruz, M. L., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., Galli, C., Grandjean, P., Gzyl, J., Heinemeyer, G., Johansson, N., Mutti, A., Schlatter, J., van Leeuwen, R., Van Peteghem, C., Verger, P., 2008. Marine biotoxins in shellfish – Azaspiracid group; Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *The EFSA Journal*: 723, 1-52.
107. Howard, M.S., Kudela, M., 2008. Yessotoxin detected in mussel (*Mytilus californicus*) and phytoplankton samples from the U.S. west coast. *Harmful Algae* 7: 646–652.
108. Samdal, I.A., Naustvoll, L.J., Olseng, C.D., Briggs, L.R., Miles, C.O., 2004. Use of ELISA to identify *Protoceratium reticulatum* as a source of yessotoxin in Norway. *Toxicon*, 44: 75-82.
109. Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Fattorusso, E., Boni, L., Pistocchi, R., 2007. Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in batch-cultures. *Harmful Algae*, 6: 707-717.
110. Paz, B., Riobo, P., Fernandez, L.M., Santiago, F., Franco, J.M., 2004. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon*, 44: 251-258.

111. Paz, B., Riobo, P., Ramilo, I., Franco, J.M., 2007. Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon*, 50: 1-17.
112. Krock, B., Alpermann, T., Tillmann, U., Pitcher, G.C., Cembella, A.D., 2006. Yessotoxin (YTX) profiles from cultures and plankton samples of the marine dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Gonyaulax spinifera*. . in 12th International Conference on Harmful Algae,. 2006. Copenhagen, Denmark: International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA) and the Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC of UNESCO).
113. Takahashi, H., Kusumi, T., Kan, Y., 1996. Determination of the absolute configuration of yessotoxin, a polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning, by NMR spectroscopic method using a chiral anisotropic reagent, methoxy-(2-naphthyl)acetic acid. *Tetrahedron Letters*, 37: 7087-7090.
114. Botana, L.M., 2000. *Seafood and Freshwater Toxins*. New York, USA: Marcel Dekker Inc.
115. Satake, M., Terasawa, K., Kadowaki, Y., Yasumoto, T., 1996. Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallops. *Tetrahedron Letters*, 37: 5955-5958.
116. Satake, M., Eiki, K., Ichimura, T., Ota, S., Sekiguchi, K., Oshima, Y., 2006., Structure of 45,46,47-trinorhomoyessotoxin, a new yessotoxin analog, from *Protoceratium reticulatum* which represents the first detection of a homoyessotoxin analog in Japan. *Harmful Algae*, 5: 731-735.
117. Aasen, J., Samdal, I.A., Miles, C.O., Dahl, E., Briggs, L.R., Aune, T., 2005. Yessotoxins in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon*, 2005. 45(3): p. 265-272.
118. Miles, C.O., Samdal, I.A., Aasen, J.A.G., Jensen, D.J., Quilliam, M.A., Petersen, D., Briggs, L.M., Wilkins, A.L., Rise, F., Cooney, J.M., MacKenzie, L.A., 2005. Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*, 4: 1075-1091.
119. Miles, C.O., Wilkins, A.L., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Quilliam, M.A., Aasen, J., MacKenzie, A.L., 2004. Isolation of 41a-homoyessotoxin and the identification of 9-methyl-41a-homoyessotoxin and nor-ring A-yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. *Chemical Research in Toxicology*, 17: 1414-1422.
120. Souto, M.L., Fernandez, J.J., Franco, J.M., Paz, B., Gil, L.V., Norte, M., 2005. Glycoyessotoxin A, a new yessotoxin derivative from cultures of *Protoceratium reticulatum*. *Journal of Natural Products*, 68: 420-422.
121. Miles, C.O., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Selwood, A.I., Jensen, D.J., Munday, R., Cooney, J.M., Beuzenberg, V., 2005. Polyhydroxylated amide analogs of yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, 45: 61-71.
122. 125. Miles, C.O., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Selwood, A.I., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Beuzenberg, V., MacKenzie, A.L., 2006. Identification of 45-hydroxy-46,47-dinoryessotoxin, 44-oxo-45,46, 47-trinoryessotoxin, and 9-methyl-42,43,44,45,46,47,55-heptanor- 38-en-41-oxoyessotoxin, and partial characterization of some minor yessotoxins, from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, 47: 229-240.
123. Miles, C.O., Wilkins, A.L., Selwood, A. I., Hawkes, A.D., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Beuzenberg, V., MacKenzie, A.L., 2006. Isolation of yessotoxin 32-O-[[beta]-l-

- arabinofuranosyl-(5'→1')-[beta]-l-arabinofuranoside] from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, 47: 510-516.
124. Finch, S.C., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Jensen, D.J., MacKenzie, A.L., Beuzenberg, V., Quilliam, M.A., Olseng, C.D., Samdal, I.A., Aasen, J., Selwood, A.I., Cooney, J.M., Sandvik, M., Miles, C.O., 2005. Isolation and identification of (44-R,S)-44,55-dihydroxyessotoxin from *Protoceratium reticulatum*, and its occurrence in extracts of shellfish from New Zealand, Norway and Canada. *Toxicon*, 46: 160-170.
  125. Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Magno, S.G., Poletti, R., Tartaglione, L., 2006. Desulfoessotoxins from Adriatic mussels: A new problem for seafood safety control. *Chemical Research in Toxicology*, 20: 95-98.
  126. Paz, B., Riobo, P., Souto, M.L., Gil, L.V., Norte, M., Fernandez, J.J., Franco, J.M., 2006. Detection and identification of glycoessotoxin A in a culture of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, 48: 611-619.
  127. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Viviani, R., 1998. Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Letters*, 39: 8897-8900.
  128. Ferrari, S., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Forino, M., Malaguti, C., Tubaro, A., Poletti, R., Yasumoto, T., Fattorusso, E., Rossini, G.P., 2004. Structure - activity relationships of yessotoxins in cultured cells. *Chemical Research in Toxicology*, 17: 1251-1257.
  129. Domínguez, H.J., Souto, M.L., Norte, M., Daranas, A.H., Fernández, J.J., 2010. Adriatoxin-B, the first C13 terminal truncated YTX analogue obtained from dinoflagellates. *Toxicon*. In Press, Accepted Manuscript.
  130. Krock, B., Seguel, C.G., Valderrama, K., Tillmann, U., 2009. Pectenotoxins and yessotoxin from Arica Bay, North Chile as determined by tandem mass spectrometry. *Toxicon*, 54: 364-367.
  131. Hoppenrath, M., 2004. A revised checklist of planktonic diatoms and dinoflagellates from Helgoland (North Sea, German Bight). *Helgoland Marine Research*. 58: 243-251.
  132. Hoppenrath, M., Elbrächter, M., Drebes, G., 2009. Marine Phytoplankton. Selected microplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt, in *Kleine Senckenberg-Reihe* 49, Ed. Obermiller, N., Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
  133. Tubaro, A., Dell'Ovo, V., Sosa, S., Florio, C. 2010., Yessotoxins: A toxicological overview. *Toxicon*. In Press, Corrected Proof.
  134. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert consultation on biotoxins in bivalve molluscs 2004, Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (IOC), World Health Organization (WHO), Oslo, Norway.
  135. Ogino, H., Kumagai, M., Yasumoto, T., Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Natural Toxins*, 5: 255-259.
  136. De la Rosa, L.A., Alfonso, A., Vilarino, N., Vieytes, M.R., Yasumoto, T., Botana L.M., 2001. Maitotoxin-induced calcium entry in human lymphocytes modulation by yessotoxin, Ca<sup>2+</sup> channel blockers and kinases. *Cellular Signalling*, 13: 711-716.
  137. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. Marine biotoxins. Series title: FAO Food and Nutrition Papers - 80. Rom: FAO. 295.
  138. Alfonso, A., de la Rosa, L.A., Vieytes, M.R., Yasumoto, T., Botana L.M., 2003. Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of



- yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 65: 193-208.
139. Pazos, M.-J., Alfonso, A., Vieytes, M.R., Yasumoto, T., Botana, L.M., 2006. Study of the interaction between different phosphodiesterases and yessotoxin using a resonant mirror biosensor. *Chemical Research in Toxicology*, 19: 794-800.
  140. Korsnes, M.S., Hetland, D.L., Espenes, A., Aune, T., 2007. Cleavage of tensin during cytoskeleton disruption in YTX-induced apoptosis. *Toxicology in Vitro*, 21: 9-15.
  141. Ronzitti, G., Callegari, G., Malaguti, C., Rossini, G.P., 2004. Selective disruption of the E-cadherin-catenin system by an algal toxin. *British Journal of Cancer*, 90: 1100-1107.
  142. Takeichi, M., 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251: 1451-1455.
  143. Dominguez, H.J., Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Franco, J.M., Fernández, J.J., 2010. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications. *Toxicon*. In Press, Corrected Proof.
  144. Konishi, M., Yang, X., Fairchild, C., Shimizu, Y., 2004. Highly cytotoxic metabolites from the culture supernatant of the temperate dinoflagellate *Protoceratium* cf. *reticulatum*. *Journal of Natural Products*, 67: 1309-1313.
  145. Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography*, 44: 1249-1255.
  146. Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K., Clardy, J., 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. Washington, DC: American Chemical Society: 207-214.
  147. Yanagi, T., Murata, M., Torigoe, K., Yasumoto, T., 1989. Biological activities of semisynthetic analogs of dinophysistoxin-3, the major diarrhetic shellfish toxin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 525-529.
  148. Hoffman, P.A., Granade, H.R., McMillan, J.P., 1983. The mouse ciguatoxin bioassay: A dose - response curve and symptomatology analysis. *Toxicon*, 21: 363-369.
  149. Dickey, R.W., Jester, E., Granade, R., Mowdy, D., Moncreiff, C., Rebarchik, D., Robl, M., Musser, S., Poli, M., 1999. Monitoring brevetoxins during a *Gymnodinium breve* red tide: comparison of sodium channel specific cytotoxicity assay and mouse bioassay for determination of neurotoxic shellfish toxins in shellfish extracts. *Natural Toxins*, 7: 157-165.
  150. Aune, T., Yasumoto, T., Engeland, E., 1991. Light and scanning electron microscopic studies on effects of marine algal toxins toward freshly prepared hepatocytes. *Journal of Toxicological and Environmental Health*, 34: 1-9.
  151. Pierotti, S., Malaguti, C., Milandri, A., Poletti, R., Rossini, G. P., 2003. Functional assay to measure yessotoxins in contaminated mussel samples. *Analytical Biochemistry*, 312: 208-216.
  152. Pierotti, S., Albano, C., Milandri, A., Callegari, F., Poletti, R., Rossini, G.P., 2007. A slot blot procedure for the measurement of yessotoxins by a functional assay. *Toxicon*, 49: 36-45.
  153. Pazos, M.-J., Alfonso, A., Vieytes, M.R., Yasumoto, T., Vieites, J.M., Botana, L.M., 2004. Resonant mirror biosensor detection method based on yessotoxin-phosphodiesterase interactions. *Analytical Biochemistry*, 335: 112-118.

154. Garthwaite, I., Ross, K.M., Miles, C.O., Briggs, L.R., Towers, N.R., Borrell, T., Busby, P., 2001. Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand. *Journal AOAC International*, 84: 1643-1648.
155. Hess, P.A., Aasen, J., 2007. Chemistry, origins, and distribution of yessotoxin and its analogues. In: *Phycotoxins - Chemistry and biochemistry*, Ed. Botana, L.M., Blackwell Publishing: Oxford, UK.
156. Campora, C.E., Hokama, Y., Yabusaki, K., Isobe, M., 2008. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ciguatoxin in fish tissue using chicken immunoglobulin Y. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 22: 239-245.
157. Briggs, L.R., Miles, C.O., Fitzgerald, J.M., Ross, K.M., Garthwaite, I., Towers, N.R., 2004. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of yessotoxin and its analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5836-5842.
158. Unger, K.K., 1995. *Handbuch der HPLC Teil 1*, Ed. E. Weber. Vol. 2. Darmstadt: GIT Verlag.
159. De Hoffmann, E., Stroobant, V., 2009. *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. Vol. 3rd., Chichester: John Wiley and Sons.
160. Lottspeich, F., Engels, J.W., 2006. *Bioanalytik*. Vol. 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
161. Shimizu, M., Kamachi, S., Nishii, Y., Yamada, S., 1991. Synthesis of a reagent for fluorescence-labeling of vitamin D and its use in assaying vitamin D metabolites. *Analytical Biochemistry*, 194: 77-81.
162. Yasumoto, T., Takizawa, A., 1997. Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61: 1775-1777.
163. Bouaicha, N., Hennion, M.C., Sandra, P., 1996. Capillary electrophoresis: a highly sensitive technique for the determination of marine phycotoxins. *Toxicon*, 34: 1084-1084.
164. Gago-Martinez, A., Leao, J.M., Pineiro, N., Carballal, E., Vaquero, E., Nogueiras, M., Rodriguez-Vazquez, J.A., 2003. An application of capillary electrophoresis for the analysis of algal toxins from the aquatic environment. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 83: 443-456.
165. Balmer-Hanchey, E.L., Jaykus, L.-A., Green, D.P., McClellan-Green, P., 2003. Marine biotoxins of algal origin and seafood safety. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 12: 29-53.
166. Terao, K., Ito, E., Yanagi, T., Yasumoto, T., 1990. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning - 5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon*, 28: 1095-1104.
167. Miles, C.O., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Selwood, A., Jensen, D.J., Aasen, J., Munday, R., Samdal, I.A., Briggs, L.R., Beuzenberg, V., MacKenzie, A.L., 2004. Isolation of a 1,3-enone isomer of heptanor-41-oxoyessotoxin from *Protoceratium reticulatum* cultures. *Toxicon*, 44: 325-336.
168. EC, Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union*, L 226/22.

169. EC, Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. Official Journal of the European Union, L 139: p. 83-127.
170. EC, Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004. Official Journal of the European Union, L 338: p. 27-59.
171. Dickey, R.W., 2008. Ciguatera toxins: Chemistry, toxicology, and detection. In: seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology, and detection, Ed. Botana, L.M., Taylor & Francis Group: Boca Rayton. p. 479-500.
172. Edwards, M., Johns, D.G., Leterme, S.C., Svendsen, E., Richardson, A.J., 2006. Regional climate change and harmful algal blooms in the northeast Atlantic. *Limnology and Oceanography*. 51: 820-829.
173. Gallardo Rodríguez, J.J., Sánchez Mirón, A., Cerón García, M., Belarbi, E., García Camacho, F., Chisti, Y., Molina Grima, E., 2009. Macronutrients requirements of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*, 8: 239-246.
174. Mitrovic, S.M., Fernandez Amandi, M., McKenzie, L., Furey, A., James, K.J., 2004. Effects of selenium, iron and cobalt addition to growth and yessotoxin production of the toxic marine dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 313: 337-351.
175. Anderson, D.M., Kulis, D.M., Sullivan, J.J., Hall, S., Lee, C., 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp.. *Marine Biology*, 104: 511-524.
176. Beani, L., Bianchi, C., Guerrini, F., Marani, L., Pistocchi, R., Tomasini, M.C., Ceredi, A., Milandri, A., Poletti, R., Boni, L., 2000. High sensitivity bioassay of paralytic (PSP) and amnesic (ASP) algal toxins based on the fluorimetric detection of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat cortical primary cultures. *Toxicon*, 38: 1283-1297.
177. Boyer, G.L., Sullivan, J.J., Andersen, R.J., Harrison, P.J., Taylor, F.J.R., 1987. Effects of the nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarens*. *Marine Biol.*, 96: 123-8.
178. Grzebyk, D., Bechemin, C., Ward, C.J., Verite, C., Codd, G.A., Maestrini, S.Y., 2003., Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Journal of Plankton Research*, 25: 1185-1199.
179. Maier Brown, A.F., Dortch, Q., Dolah, V.F.M., Leighfield, T.A., Morrison, W., Thessen, A.E., Steidinger, K., Richardson, B., Moncreiff, C.A., Pennock, J.R., 2006. Effect of salinity on the distribution, growth, and toxicity of *Karenia* spp.. *Harmful Algae*, 5: 199-212.
180. Peeters, J.C.H., Haas, H., Peperzak, L., Wetsteyn, L.P.M.J., 1991. Limiting factors for phytoplankton in the North Sea. *Water Science & Technology*, 24: 261-267.
181. Paz, B., Vazquez, J.A., Riobo, P., Franco, J.M., 2006. Study of the effect of temperature, irradiance and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate

- Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. Marine Environmental Research, 62: 286-300.
182. Paz, B.R., P., Ramilo, I.; Franco, J. M., 2007. Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. Toxicon, 50: 1-17.
  183. Mitrovic, S.M., Hamilton, B., McKenzie, L., Furey, A., James, K.J., 2005. Persistence of yessotoxin under light and dark conditions. Marine Environmental Research, 60: 397-401.
  184. Lim, P.-T., Ogata, T., 2005. Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). Toxicon, 45: 699-710.
  185. Parkhill, J., Cembella, A., 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. Journal of Plankton Research, 21: 939-955.
  186. Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Guerrini, F., Pistocchi, R., Boni, L., 2003. Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic sea revealed by LC-MS analysis. Toxicon, 42: 7-14.
  187. Suzuki, T., Horie, Y., Koike, K., Satake, M., Oshima, Y., Iwataki, M., Yoshimatsu, S., 2007. Yessotoxin analogues in several strains of *Protoceratium reticulatum* in Japan determined by liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1142: 172-177.
  188. Satake, M., Ichimura, T., Sekiguchi, K., Yoshimatsu, S., Oshima, Y., 1999. Confirmation of yessotoxin and 45,46,47-trinoryessotoxin production by *Protoceratium reticulatum* collected in Japan. Natural Toxins, 7: 147-150.
  189. Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T., 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. Journal of Applied Phycology, 1: 147-152.
  190. Oshima, Y., Blackburn, S. I., Hallegraeff, G.M., 1990. In: Comparative Studies on Paralytic Shellfish Toxin Profile of Dinoflagellates and Bivalves. Elsevier Science Publishing Co., Inc. p. 391-396.
  191. Aasen, J., Samdal, I.A., Miles, C.O., Dahl, E., Brigg, L.R., Aune, A., 2005. Yessotoxin in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Prorocentrum reticulatum*, metabolism and depuration. Toxicon, 45: 265-272.
  192. MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T., 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. Toxicon, 40: 1321-1330.
  193. Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., 2002. Direct detection of yessotoxin and its analogues by liquid chromatography coupled with electrospray ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 968: 61-69.
  194. Morton, S.L., Vershinin, A., Leighfield, T., Smith, L., Quilliam, M., 2007. Identification of yessotoxin in mussels from the Caucasian Black Sea Coast of the Russian Federation. Toxicon, 50: 581-584.
  195. Samdal, I.A., Aasen, J.A.B., Briggs, L.R., Dahl, E., Miles, C.O., 2005. Comparison of ELISA and LC-MS analyses for yessotoxins in blue mussels (*Mytilus edulis*). Toxicon, 46: 7-15.
  196. Wright, J.L.C., Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. Food Research International, 28: 347-358.

## 11 Erklärungen

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist;

dass ich die Dissertation selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe;

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde;

dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt meiner vorgelegten Dissertation stehen;

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe;

dass ich weder die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

.....

Karin Röder

Jena, 08. Mai 2010

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Anschrift Dornburger Str. 21  
07743 Jena  
 01 52 - 0 44 14 517  
 [karin.roeder@uni-jena.de](mailto:karin.roeder@uni-jena.de)

Geburtsdatum 12. April 1983  
Geburtsort Erfurt  
Familienstand ledig  
Staatsbürgerschaft deutsch

### Tätigkeit

Seit 04.2008 Friedrich-Schiller-Universität, Jena  
Promotionsstudentin am Lehrstuhl Lebensmittelchemie  
Titel: „Analytik und Vorkommen lebensmittelrechtlich relevanter mariner Biotoxine unter besonderer Berücksichtigung von Ciguatoxinen (CTXs) und Yessotoxinen (YTXs)“

### Studium

10.2006 – 03.2008 Friedrich-Schiller-Universität, Jena  
Diplomarbeit am Lehrstuhl Lebensmittelchemie

Seit 10.2002 Friedrich-Schiller-Universität, Jena  
Studium der Ernährungswissenschaften

### Schulbildung

09.1999 – 06.2002 Ludwig-Erhard-Schule, Erfurt  
Abschluss: Abitur

### Sonstige Kenntnisse

Sprachen	Englisch	sehr gut (in Wort und Schrift)
	Französisch	Schulkenntnisse
MS-Office	Word, Excel, Power Point	sehr gut
Sigmaplot		sehr gut
ISISdraw		Grundkenntnisse
Statistik	SPSS	Grundkenntnisse
Führerschein	Klasse B	

## **Danksagung**

Die praktischen Arbeiten wurden am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie am Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich Schiller Universität Jena in der Zeit von April 2008 bis März 2010 unter der Leitung von Herrn Prof. Bernd Luckas durchgeführt.

Vor allem gilt mein Dank Herrn Prof. Bernd Luckas, der nicht nur durch die Bereitstellung des interessanten Themas sehr viel Vertrauen in meine Arbeit legte, sondern während der Betreuung durch konstruktive Diskussionen, Korrekturen und Anregungen einen großen Beitrag für das Gelingen leistete. Außerdem möchte ich ihm dafür danken, dass er die Teilnahme an wissenschaftlichen Aufenthalten und internationalen Kongressen immer mit Engagement unterstützte. Dadurch wurde mir die Gelegenheit geboten Erfahrungen zu machen, welche Impulse für die fachliche sowie die persönliche Entwicklung setzten.

Besonders möchte ich Herrn Dr. Gunnar Gerdt für dessen fachliche als auch menschliche Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Aufgaben an der Biologischen Anstalt Helgoland des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung danken. Außerdem gilt ihm der Dank für sein unermüdliches Korrekturlesen und die konstruktiven Beiträge, Anregungen und Diskussionen.

Mein Dank gilt außerdem der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Allan Cembella, insbesondere Herrn Dr. Bernd Krock, der mir die Analyse des mit YTX belasteten Materials am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven ermöglichte und mir bei der Auswertung dieser Daten zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie am Institut für Ernährungswissenschaften für deren Mitarbeit und Unterstützung danken. Dabei gilt mein Dank besonders Frau Katrin Erler, für ihre fachliche als auch moralische Unterstützung. Aber auch die Zusammenarbeit mit den Kollegen am Lehrstuhl, Elke Stoll, Tina Helbig, Thomas Krüger sowie den ehemaligen DoktorandInnen und DiplomantInnen, war durch die entspannte Atmosphäre immer wieder eine Freude. In diesem Zusammenhang möchte ich auch allen

Kollegen, der Biologischen Anstalt Helgoland für die enge Zusammenarbeit und die herzliche Aufnahme am Institut danken. Denn durch den regen, fachübergreifenden Austausch wurde nicht nur die vorliegende Arbeit bereichert. Hier gilt mein Dank besonders Frau Dr. Antje Wichels, Martin Löder, Christina Gebühr, Florian Hantzsche, Kathleen Herrig, Rebecca Störmer, Judith Luckas, Sonja Oberbeckmann und Christine Karstens.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Mona Hoppenrath (Forschungsinstitut Senckenberg, Wilhelmshaven) für die Bereitstellung des *P. reticulatum*-Stammes aus der Nordsee, dessen Untersuchungen das Fundament der vorliegenden Arbeit begründen. Außerdem danke ich ihr für ihre fachlichen Beiträge zur vorliegenden Arbeit.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch weiteren Wissenschaftlern für die Bereitstellung diversen mit Ciguatoxin und Yessotoxin belasteten Materials danken: Herrn Dr. Steven Kibler, Prof. Patricia Tester (National Ocean and Atmospheric Administration (NOAA), Beaufort, USA), Ho Van The, Prof. Prof. Lam Nguyen- Ngoc (Institute of Oceanography, Nha Trang, Vietnam) und Prof. Kazuhiko Koike (Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan).

Darüberhinaus danke ich meiner Familie und Freunden, besonders meinen Eltern Marina und Egbert Röder, meinen Geschwistern Diana und Robert und meinen Großeltern, die mich immer durch ihr uneingeschränktes Vertrauen bestärkten und ohne deren Unterstützung und Liebe diese Aufgabe hätte weder begonnen noch abgeschlossen werden können. Auch danke ich Christin Neumann für ihre Unterstützung. Außerdem danke ich meinem Freund René Geithner, der mich während der Promotion sowohl moralisch stärkte als auch verständnisvoll mit Rat und Tat zur Seite stand.